

(原著第二版)

Encyclopedia of Pharmaceutical Technology

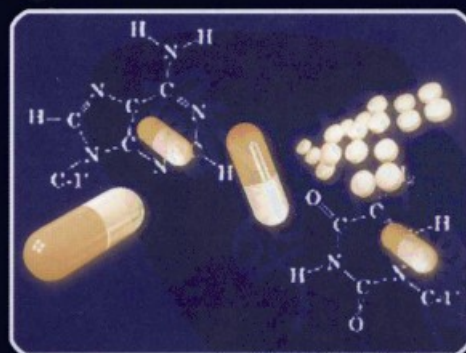
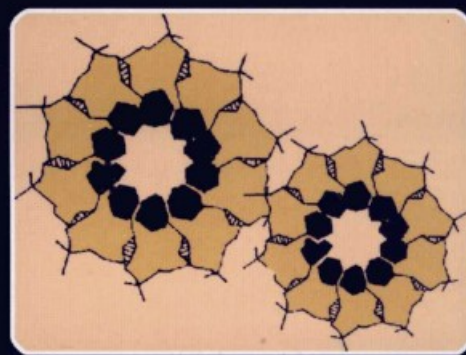
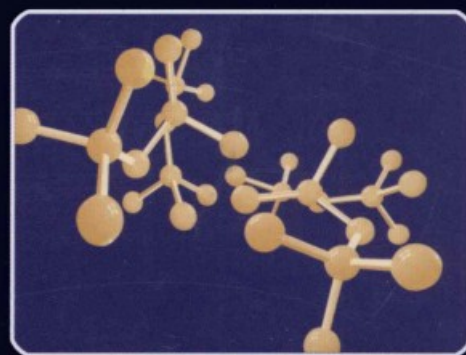
制剂技术 百科全书

第二卷

主 编 [美] J.斯沃布里克

[美] J.C.博伊兰

主 译 王 浩 侯惠民



科学出版社
www.sciencep.com

informa
healthcare

- 由200多位国际知名专家合作编写，被誉为药学工作者的“圣经”
- 由制剂领域的权威专家组织翻译
- 理论性强：详细阐述了与药剂相关的基本理论
- 实用性佳：众多的实例具有很好的实践指导作用
- 内容新颖全面：涉及药剂及其相关学科的各个方面，反映了这些领域的最新进展
- 适用面广：对从事药物制剂研究、教学和生产的药学工作者均有重要的参考价值

ISBN 978-7-03-023131-4



9 787030 231314 >

定价：680.00 元（共三卷）

制剂技术百科全书

Encyclopedia of Pharmaceutical Technology

(原著第二版)

第二卷

主 编 〔美〕 J. 斯沃布里克

〔美〕 J. C. 博伊兰

主 译 王 浩 侯惠民

副主译 陈桂良 陆伟根 陆伟跃

[http://www.chinapat.com/
jjb2005精品书柜](http://www.chinapat.com/jjb2005精品书柜)

No: QQ 429122294

现代中药制药论坛

古
遗
锋
剑

科 学 出 版 社

北 京

图字: 01-2005-3962 号

内 容 简 介

本书为 *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* 第二版的中文翻译版, 涉及药剂学的各个方面, 收录了当代药剂学以及相关领域权威学者的著作 200 多篇。在药物剂型的设计、开发、立法、生产以及商业化方面给予了较多关注, 详细介绍了制剂技术, 强调了生物药剂学、分析化学、质量保证、药物安全性以及生产过程在制剂领域的重要性。

本书内容翔实, 参考文献丰富, 理论性和实用性强。对从事药物制剂研究、教学和生产的药学工作者有重要的参考价值。

Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 2nd Edition, a three volume set
James Swarbrick, James C. Boylan

Copyright © 2002 by Marcel Dekker, Inc.

Authorized translation from English language edition published by Marcel Dekker, part of Taylor & Francis Group LLC. All rights reserved. 本书原版由 Taylor & Francis 出版集团旗下 Marcel Dekker 出版公司出版, 并经其授权翻译出版。版权所有, 侵权必究。

Copies of this book sold without An Informa Healthcare sticker on the cover are unauthorized and illegal. 本书封面贴有 Informa Healthcare 防伪标签, 未贴防伪标签属未获授权的非法行为。

图书在版编目(CIP)数据

制剂技术百科全书/(美)J. 斯沃布里克 (Swarbrick J.), (美)J. C. 博伊兰 (Boylan J. C.) 主编; 王浩, 侯惠民主译. 原著第二版. —北京: 科学出版社, 2009

ISBN 978-7-03-023131-4

I. 制… II. ①斯… ②博… ③王… ④侯… III. 制药工业-百科全书 IV. TQ46-61

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 153361 号

策划编辑: 周巧龙 张淑晓 周 强 / 责任校对: 钟洋等
责任印制: 钱玉芬 / 封面设计: 耕者设计工作室

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

2009 年 1 月 第 一 版 开本: 889×1194 1/16

2009 年 1 月第一次印刷 印张: 174 3/4

印数: 1—2 000 字数: 6 542 000

定价: 680.00 元 (共三卷)

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈科印〉)

翻译委员会

(以姓氏拼音排序)

- | | |
|-----|--------------------------|
| 陈 钢 | 上海市食品药品检验所，主任药师 |
| 陈桂良 | 上海市食品药品检验所，主任药师 |
| 戴经铨 | 上海医药工业研究院，研究员 |
| 杜敏琼 | 上海医药工业研究院，研究员 |
| 傅 民 | 上海现代制药股份有限公司，高级工程师 |
| 葛庆华 | 药物制剂国家工程研究中心，研究员 |
| 龚 忠 | 上海现代制药股份有限公司，高级工程师 |
| 何 军 | 上海医药工业研究院，副研究员 |
| 贺 芬 | 药物制剂国家工程研究中心，研究员 |
| 侯惠民 | 药物制剂国家工程研究中心，研究员，中国工程院院士 |
| 乐 健 | 上海市食品药品检验所，副主任药师 |
| 刘 浩 | 上海市食品药品检验所，主任药师 |
| 陆伟根 | 上海医药工业研究院，研究员 |
| 陆伟跃 | 复旦大学，教授 |
| 潘 俊 | 复旦大学，副教授 |
| 唐黎明 | 上海市食品药品检验所，主任药师 |
| 王 浩 | 药物制剂国家工程研究中心，研究员 |
| 王国平 | 上海医药工业研究院，研究员 |
| 王其灼 | 上海医药工业研究院，研究员 |
| 徐信昌 | 药物制剂国家工程研究中心，高级工程师 |
| 杨福秋 | 上海医药工业研究院，研究员 |
| 易大年 | 上海医药工业研究院，研究员 |

翻译人员

(以姓氏拼音排序)

鲍 英	蔡宏奎	蔡培林	柴旭煜	常 艳	陈 昂
陈 芳	陈 卫	陈 燕	陈 阳	陈桂良	陈满仓
陈志明	陈祝康	程志红	邓万定	丁存刚	杜敏琼
杜 玥	傅 民	高 凡	高东雁	葛庆华	龚 忠
龚明涛	韩 雪	何 军	何 萍	何 蔚	贺 芬
贺 宁	洪赞飞	侯惠民	侯 建	胡蓉梅	黄 冲
黄 卓	简龙海	金 樑	金 蔚	金玉琼	乐 健
李 翀	李 丁	李 杰	李 军	李 明	李 妍
李瑞新	刘 丹	刘 敏	刘小叶	刘笑芬	卢文芸
吕坚伟	栾福成	栾瀚森	罗大忱	罗宏伟	罗华菲
马少华	潘 峰	潘 弘	潘 俊	邱维佳	裘 渊
沈航孝	盛民立	石敬敏	宋浩亮	孙冠男	唐海霞
陶芸莺	滕 洋	万丽卿	王 浩	王 娟	王国平
王莉莉	王恬力	王文苹	魏 刚	闻洪亮	吴金金
吴小虎	吴晓盈	奚 泉	谢 操	谢家树	熊龙启
徐 楠	徐 喆	严幼达	羊 臻	杨 莉	于垂亮
岳 鹏	战 丹	张 辉	张 军	张 柳	张春娜
张小红	张晓红	张毅兰	张玉波	赵 铁	赵 雁
赵惠清	赵晓群	赵炎龙	支晓瑾	周 洁	周 臻
周明眉	周晓丽	周晓通	周玉波	朱 娟	朱 萍
祝 林					

中文版序

药物制剂学科在近些年发展迅速，成为新药研发技术链上越来越重要的一环。药剂这门应用学科涉及剂型设计、生产设备、分析测试和法规管理等各个方面，需要技术人员有较广的知识面。

美国 Marcel Dekker 出版公司出版的 *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* 是一部全面介绍制剂及相关领域各个方面的专业知识的百科全书。原书通俗易懂，著者都是该领域的权威学者，并附有大量的参考文献。

本书涵盖与制剂相关的剂型的设计与制备、分析测试技术、美国和全球的法规要求、中试工厂和制剂设备的设计、药物临床试验的管理、药品的推广和促销等各个方面。对于药剂学科的学生或技术人员都有较高的参考价值。

本书的主译和副主译等均是在药剂学领域从事多年科研和教学的药剂专家，有丰富的经验。在他们的组织下，由我院药物制剂国家工程研究中心和制剂部、上海市食品药品检验所、复旦大学药学院以及我院所属上海现代制药股份有限公司的众多人员集体翻译了这部篇幅宏大的专著。这种努力，值得称赞。

相信本书的出版，必将有益于我国制剂的科研、生产和教学。

朱宝泉

上海医药工业研究院院长，研究员，博士生导师

2008 年 2 月

译者说明

《制剂技术百科全书》包含了药剂学的各个方面，收录了当代药剂学以及相关领域权威学者的著作。原书第一版的第一卷于1988年出版，最后一卷于2001年出版。这套一共20卷的百科全书包括正文、图示、表格、参考文献以及索引一共9000多页，涵盖了300多个条目，范围非常宽。第二版在药物剂型的发现、开发、立法、生产以及商业化方面给予了更多关注。不仅详细介绍了制剂技术，还强调了生物药剂学、分析化学、质量保证、药物安全性以及生产过程，但没有把注意力停留在某一个或某一类药的化学和（或）药理学层面。

第二版将近300个条目重新分类整理，使其更有序，便于查阅。同时，将卷数减少到了3卷，每卷都有1000多页，3卷同时出版。新版是旧版的浓缩版，但其内容是一致的。第二版中收录的旧版条目内容都加以更新，还增加了一些新的条目。同时，旧版中的一些相关的条目也被重新整理归到第二版的同一个条目下，反之亦然。条目的调整反映了药剂学科特定领域的最新进展。与旧版相同，第二版的著者都是该领域的权威学者。在第二版于2002年出版后又相继出版了增补本，增加了40多个条目。

在科学出版社的大力支持下，我们决定将这部优秀的书籍介绍给我国的药学科技人员。为此我们组织了药物制剂国家工程研究中心、上海医药工业研究院、上海市食品药品检验所和复旦大学药学院等单位的工作人员及部分研究生进行全书的翻译。

本书的翻译工作得到了上海医药工业研究院老一辈专家王其灼、杨福秋、易大年、戴经铨等的大力支持。科学出版社的编辑为本书的出版也付出了大量的心血。药物制剂国家工程研究中心的栾瀚森、徐瑛、刘笑芬编制了本书的索引，滕洋翻译了原书全部的插图。在此一并致谢。

在本书的翻译过程中，原著第三版已于2007年10月出版了。经过对比，第三版与第二版相同的条目，除了法规部分外，技术部分的修订幅度不大，但增加了50多个条目。希望以后有机会再将这50多条以增补本的形式介绍给大家。

由于原著篇幅很大，翻译、校对的工作量很大。原著内容涉及面广，限于译者的水平，错误和不准确的内容在所难免，希望国内广大药学工作者予以批评指正。

王 浩 侯惠民

2008年10月

英文版前言

近年来，药剂学科和技术得到了很大的发展。越来越多的人认识到药物剂型对疾病治疗的重要作用，同时也认识到优化药物在体内的传释过程能推动治疗学的发展。因此，越来越多的专业人员投入到药物及其剂型的设计、研发、生产、测试和法规建立的各个环节，药剂专业水平也在不断提高。

《制剂技术百科全书》是一本独一无二、通俗易懂的药剂学科百科全书，它涵盖了药物制剂技术各个方面的专业知识。对于进行药剂学相关课题的初期准备或者是为了提高某方面专业知识和水平的人来说，都能从本书中找到需要的信息。

17 年来，我们一直在整理相关资料，同时也与相关作者保持联系。1988 年《制剂技术百科全书》第一版诞生了，第一版的最后一卷（第 20 卷）也于 2001 年出版。该书出版后，其实用性得到了大家的认可，于是我们着手准备第二版。第二版涵盖了药剂及其相关领域的最新进展，该书不仅印刷出版，也可以从网上获得，并且每季度都会更新并进行扩充。

《制剂技术百科全书》印刷版共 3 卷，3000 多页，由 200 多个主题条目组成。每篇文章都是由相关领域的专家撰写的，反映了该领域的最新研究进展。

《制剂技术百科全书》电子版包括了印刷版的全部内容，并且还提供了关键词搜索引擎以及彩色图示。新加入的条目以及修订条目会每季度更新并且将更新内容以电子版形式提供给用户。

在此，我们要感谢在本书撰写和印刷过程中无数给予过帮助的人们。特别要感谢本书各位作者的努力。许多作者撰写了多篇文章。显然，没有这些世界级科学家的聪明才智和辛勤工作，就没有《制剂技术百科全书》的诞生。

出版商 Marcel Dekker, Inc. 一直以来都对我们的工作很支持，在编辑出版方面给了我们很大的帮助。特别要感谢百科全书编辑部的经理 Carolyn Hall，她的鼎力相助使本书得以顺利出版。

最后，我们也不会忘了要感谢你们，亲爱的读者朋友们，感谢你们一直以来的关注和支持。希望本书能让你们满意。同时，也随时欢迎你们的批评指正。

James Swarbrick

James C. Boylan

目 录

中文版序
译者说明
英文版前言

第一卷

半固体制剂	1
保证药品质量的微生物学	15
层流设备的应用和操作	23
超级崩解剂的性质及其作用	38
超声波雾化器	51
承包生产	58
处方药与非处方药的广告及促销	66
代谢物鉴定在药物发现中的应用	73
单克隆抗体在药物靶向给药系统中的应用	79
滴定测量法	99
淀粉及其衍生物	111
电位分析	117
锭剂	129
定量吸入剂	133
动物在药物研发中的作用	146
对受控生产过程的微生物监控	156
多肽和蛋白质的非侵入性给药	170
多肽和蛋白质的经皮吸收	185
多肽及蛋白质的肺部吸收	198
儿科用药和剂型	207
耳用制剂	224
翻转混合器中的混合与分层	232
仿制药物及其等效性	245
放射性化学分析方法	249
非处方药	259
非环糊精类药物复合物技术	272
非临床研究质量管理规范综述	280
非注射给药剂型	287
分配系数	297
分析方法的验证	303
粉末和固体制剂用赋形剂	320
粉末剂型	329
粉末取样	338
辐照灭菌法	346
赋形剂：安全性评价	355
赋形剂：在注射剂中的作用	360

FDA: 药品管理者	380
干粉吸入剂	388
干粉吸入剂: 新兴的技术	399
干热灭菌法	405
干燥和干燥设备	410
工艺放大和产品批准后的变更	422
共沉淀和熔融	426
固体材料的流动性	432
光谱分析方法: 红外光谱学	450
光谱分析方法: 近红外光谱技术	461
光谱分析方法: 漫反射光谱分析	466
光谱分析技术: 荧光光谱法	475
光谱分析技术: 原子吸收和发射分光光度法	488
光谱分析技术: 质谱法	494
光谱分析技术: 紫外可见分光光度法	506
过滤器和过滤	517
含有明胶的制剂的溶出特性改变	525
罕用药物	538
化妆品及其与药物的关系	544
环糊精包合技术	550
环氧乙烷灭菌法	575
混悬剂	583
火焰光度法	593
极谱分析和伏安法分析	596
挤出工艺和挤出设备	606
计算机系统的验证	618
计算机药物辅助设计	623
剂型的发展历史及基本制剂知识	638
剂型设计的理化途径	661
胶体和胶体释药系统	669
结晶对产品开发、加工和性能的重要性	679
近红外光谱法用于片剂评价	695
经皮给药中的超声促渗	704
晶癖的改变和剂型的性能	715
镜片护理产品	726
均质和均质机	735
颗粒的粒径分析	742
可生物吸收聚合物	754
口服固体制剂的薄膜包衣	762
口服固体制剂的熔融工艺	779
口服液体制剂	783
蜡	792
老年人用药剂量和剂型	801
类脂在药剂学中的应用	816
冷冻干燥	827
冷冻干燥的工艺放大	847
冷却工艺和冻结技术	859
离子导入	869
量热技术在药物研究与开发中的应用	879

临床数据管理系统	889
临床药动学和药效学	896
第二卷	
临床用药品生产的 GMP 要求	911
流化床制粒	917
酶联免疫测定法及相关生物分析法	923
美国国内的医疗保健体制	936
美国以外的医疗保健体制	944
免疫分析	950
纳米粒给药系统	961
凝胶和冻胶	976
凝聚和相分离	990
欧洲药品评价委员会	1003
泡腾制剂	1008
片剂处方	1018
片剂的测定	1027
片剂的生产	1034
前药设计	1049
潜溶剂和潜溶	1054
确定失效日期	1065
热分析在药物及药物制剂中的应用	1071
热熔挤出技术	1094
热原和细菌内毒素检查	1108
溶出度和溶出度试验	1118
乳剂和微乳	1127
软胶囊	1141
色谱分析技术：薄层色谱法	1150
色谱分析技术：高效液相色谱法	1162
色谱分析技术：气相色谱法	1171
伤口包扎敷料	1218
设备清洁	1229
生物技术和生物产品	1238
生物体液分析	1246
生物药剂学	1255
湿热灭菌法	1268
世界卫生组织 (WHO) 继续全球协调对医药产品的要求	1277
手性光学分析法	1280
兽用剂型	1294
树状大分子	1321
水凝胶	1339
肽类和蛋白质类药物的口服吸收	1356
肽类和蛋白质类药物的口腔黏膜吸收	1369
替代药物	1381
统计过程控制和工序能力	1394
统计学方法	1404
危险化学品和药品的处理	1416
微球技术及其应用	1420
微生物鉴别用 DNA 探针	1430

无菌操作及其工艺验证	1438
无纸文档系统	1448
吸收促进剂	1459
现代调剂学	1465
先进的无菌工艺：吹瓶-灌装-封口	1476
香料和矫味剂	1481
项目管理	1490
血液替代品：碳氟化合物途径	1498
血液替代品：血红蛋白氧载体	1513
X射线粉末衍射法	1534
压片的模具	1546
压片工艺的机器原理、设计及故障处理	1558
压片机的仪器化	1571
牙科用品	1590
研发密集的制药工业的经济特征	1603
药代动力学：食物和禁食的影响	1606
药典标准：美国药典和国家处方集	1616
药典标准：日本药典	1628
药典标准的协调	1632
药典标准：欧洲药典	1641
药品的包装材料：玻璃	1646
药品的保存	1658
药品的微生物控制	1665
药品的质量保证	1673
药品及药物系统中的表面活性剂	1681
药品临床试验管理规范（GCP）概述	1692
药品生产质量管理规范（GMP）概述	1697
药品中的顶空氧分析	1702
药品中的水分	1710
药品主文件	1723
药物不良反应	1727
药物的安全性评价	1736
药物的蛋白结合	1752
药物的多态现象	1763
药物的光解作用	1771
药物的剂量确定：给药方案和剂量应答	1777
药物的临床评价	1786
药物的生物合成	1794

第三卷

药物的生物利用度和生物等效性	1821
药物的生物转化	1829
药物的水解	1839
药物的外包	1844
药物的吸收	1860
药物分析中的电化学检测	1870
药物及其制剂的吸水性	1887
药物开发的管理	1900
药物开发中的遗传因素	1910

药物开发中先导物优化的分子和细胞途径	1918
药物滥用	1927
药物设计的基本原理和应用	1935
药物受体：在后基因时代的发现	1942
药物输送：鼻腔给药	1957
药物输送：肺部给药	1963
药物输送：局部和透皮给药	1969
药物输送：控制释放	1981
药物输送：口服结肠定位给药	2000
药物输送：口服途径	2012
药物输送：口腔黏膜途径	2030
药物输送：脉冲系统	2039
药物输送：眼部途径	2048
药物输送：阴道途径	2056
药物输送：直肠给药	2078
药物输送：注射给药途径	2088
药物输送中的黏膜黏附水凝胶	2098
药物输送中的液态结晶	2111
药物相互作用	2125
药物信息系统	2131
药物在水性溶媒中的增溶	2136
药物制剂用赋形剂	2156
药物治疗方面的错误	2166
药学单元操作的原理	2176
药学数据的数学建模	2188
药学中的单元过程操作	2198
药用辅料测试：法规和临床前的观点	2219
药用隔离装置	2229
药用气雾剂的放射性标记及用于肺部沉积试验的 γ 射线闪烁扫描成像技术	2235
药用植物	2243
药用着色剂	2253
液雾剂	2270
异构现象	2290
疫苗及其他免疫产品	2307
影响口服药物输送的生理学因素	2324
硬胶囊	2332
用于药物输送的单克隆抗体	2343
用于制剂产品开发的专家系统	2358
张力	2375
蒸发与蒸发器	2384
蒸汽灭菌法的生物验证	2391
致癌性试验的历史、现状和前景	2399
质量体系管理	2410
直接压片	2415
制剂工艺验证	2424
制剂技术转化的考虑因素	2434
制剂中的流变学	2440
制丸技术	2454
制药工业用弹性体	2464

制药工业中的工艺化学	2476
制药工业中的滚压制粒技术	2486
制药技术中的二次电镜法	2500
制药技术中的核磁共振波谱学	2528
制药领域中的计算机	2543
制药设备的电力系统	2552
制药设备的腐蚀	2557
制药设备用材料	2568
制药用水	2573
中试工厂的设计	2581
中试工厂的运转	2592
注射剂	2604
注射剂无菌工艺的病毒灭活问题	2613
专利：国际观点	2627
专利：美国观点	2636
自氧化和抗氧化	2645
最优化方法	2658
作为药物载体的可生物降解聚合物	2670
ZETA 电位	2683
索引	



临床用药品生产的 GMP 要求

David L. Chesney

KMI, Waltham, Massachusetts, U. S. A.

Mark L. Balboni

KMI, Laguna Niguel, California, U. S. A.

简介

GMP 对临床用药品的适用性

美国《联邦食品、药品和化妆品管理法案》(以下简称《法案》)第 21 条 301 款规定,有以下情况的被认定为假药:药品生产的方法、设备或控制方法及其生产过程、包装或储存不符合或者没有按现行 GMP 操作,从而无法保证该药品达到法定的安全性、同质性和规格等,也无法保证该药品达到法定的质量和纯度指标,却声称自己符合 GMP 标准的药品 [U. S. C. 351 (a) (2) (B)]。该条款参考的是 CGMP (现行药品生产质量管理规范),简称 GMP。

很明显,该法律所规定的要求非常宽泛(它并没有规定必须遵循的具体生产步骤,也没有规定为了确保符合要求,生产现场必须采取的控制措施)。《法案》附带的条文赋予了美国卫生和福利部发布法规以保证法案有效实施的权利。实际上该项权利被委托给食品与药品监督局的专员。FDA 运用该权利颁布了一项条款,见联邦法案第 21 条,提出 GMP 适用于所有药品的生产以及成品药(包括人用药和兽药)生产过程中的控制,详见联邦法案第 211 部分第 21 条。法案第 211 部分定义了 CGMP 或 GMP (本文简称 GMP)。虽然 FDA 在一系列药品管理规范出台之前已经充分考虑了医药产业的盛行操作,但是 FDA 制定 GMP 的基础却是该操作在保证药品安全性、质量和纯度上是否可行、有价值^[1]。我们同样指出,最终形成的 GMP 标准最初是联邦注册委员会的提案,是公众广泛参与立法的产物。受影响的公众,包括整个医药行业,都有机会在定案前对提案发表意见。

因为 GMP 应用于所有“成品药”,并且是法定必须遵守的,所以显然对于临床用药品的生产也适用。然而,始终存在一种争论,并一直持续到现在:公司如何区分 GMP 规则应用在临床用药品和全面商业产品上的不同及在哪些方面不同。

背景信息

临床用药品,也称临床试验药品,是在进行新药临床研究时使用的人用或兽用药物^[2]。临床用药品和商业药品所使用的设备和技术在很多方面是没有区别的。在其他方

面,比如说生产规模、生产过程的稳定性、临床试验药品标签、有效期(因此必须提供稳定性数据)、最终包装、甚至配方和剂量,这些都是我们在制定合理临床用药品的 GMP 时必须注意的重要区别。

药物治疗中所使用的没有药理活性却能带来一定疗效的安慰剂,或作为新药临床实验研究控制的安慰剂同样应符合现行的药品生产质量管理规范^[3]。因为安慰剂不含活性成分,无法测定药效,但是非活性成分却是可以确定的。这点及其他与安慰剂有关的几点应注意问题也要求 GMP 给予相关解释。

临床用药品的生产涉及一期到四期临床试验用药,可以包括实验室规模的、中试规模的操作(一批的规模通常大于实验室,但比商业规模要小)。临床用药品的生产设备及生产场所应与商业化合同生产一致^[4]。

GMP 适用于为临床实验研究而生产的人用和兽用新药,但是那些在产品生命周期早期所进行的“基础性研究”、科学探索或临床前试验不需要遵守 GMP。

FDA 对临床用药品生产厂家的视察

在《法案》的规定下,FDA 有权“……在合理的时间去任何生产、加工、包装或储存食品、药品、医疗器械或者化妆品厂家……”[《法案》第 704 (a) 部分]。很明显,这项权利包含生产或进行临床用药品分析(如批放行、稳定性以及误差研究)的厂房。“合理的时间”被官方解释为任何时间内有控制的操作发生的时候,不管日期、星期几、白天或者晚上。视察通常不会事先通知厂方,但是个别情况除外。

实际操作中,FDA 只是偶尔视察临床用药品生产场所。然而,不能有 FDA 不会去临床用药品生产厂家视察的错觉。生产场所应随时做好准备以应对 FDA 的视察。FDA 视察临床用药品生产厂家的原因有:重复视察已审查通过的商业生产厂家;对仅提供临床试验用药的合同生产厂家进行例行视察;发现药品缺陷以后导致的视察,尤其当该缺陷与患者的不良反应有关时(如注射剂的污染);对临床用药物召回的反应或者其他因素。FDA 对第三期临床用药品生产视察的可能性要高于第一期和第二期。

每个场所都应有人非常熟悉 FDA 检查的流程,为检查进行人员准备,当检查开始时从公司角度进行应对。本章的目的并不在于详细解释如何应对 FDA 的视察,但是作者

却强烈建议每个公司的最核心人员都应经过相关培训，为 FDA 的视察做好准备，并制定详细的政策和程序来配合完成 FDA 的视察。

理解和使用 FDA 文件

为了在具体环境中恰当解释和使用 GMP，需要进行研究和判断。我们可以从 FDA 各种公开的文件中获得帮助。大部分文件可从 FDA 的网站上获得，网址为 <http://www.fda.gov>。例如，有用的文件包括指南、生物制品评价和研究中心（CBER）发表的应关注要点、规范政策指南、视察的技术指导、规范项目指南和项目手册等。

解释 GMP 对临床用药物管理的一个最主要文件是 FDA 在 1991 年发布的新药制备指南（人用药和兽用药）。这份指南举例说明了药品研发活动何时需符合 GMP 要求和药品特定研发时期相应的应符合程度，以及 FDA 对于 GMP 条例重要章节的指南。

FDA 在 GMP 应用于临床用药品的地位在 1978 年 9 月 29 日 GMP 修订版（联邦注册，Vol. 43, No190, 45013~45336）的导言中得到明确表述：GMP 条例适用于所有人用或兽用药品的制备，包括那些仍处于研究阶段的药品。处于研发阶段的药品的生产过程应建立完整的文档并严格控制，以保证该药品的重现性，并且提供进一步的测试，保证最终能进行商业生产。

规范政策指南是 FDA 的内部文件，提供 FDA 现场办公在 GMP（以及其他法律）中的执法先例。它们可以在 FDA 官方网站的“现场操作”或“法规事务办公室”页面中找到，标明的题目为“规范参考”。

应关注的要点是生物制品评价和研究中心对一些论题，如病毒灭活、转基因动物和其他专门技术项目的论题性政策陈述。

规范项目为 FDA 视察员提供了在很多行业实施的视察程序指导。某些（但不是全部）可以通过法规事务办公室连接到相应的 FDA 网页上。

医药行业出版物和报告会也可以提供一些有用的信息，但用户应提防过于注重 FDA 专员的“讲台政策”或者阅读过多的其他公司发布的视察引用。如果读者不能了解各个陈述的所有方面，这些资源可能会误导读者。

应用于临床用药物的选定：GMP 系统

1. 质量机构

CFR21 条 211.22 款规定了“质量控制部门”（QCU）的责任。各个临床用药品质量控制部门和商业药品质量控制部门的角色和职责是没有区别的。FDA 认为，配备合适的职员和受过培训的质量控制部门的存在，并被授权有效实施其职责是 GMP 实施中很重要的一个因素。

厂家应该意识到“质量控制部门”是一个通用的词语，

公司指定的术语可能与这个词语有所不同。例如，在很多公司中，这个部门就是“质量保证”。其他常用术语包括法规管理、质量保证/质量控制，或在某些情况下，法规事务组完成了许多但不是全部质量控制部门的功能。在一些小公司或者虚拟组织中，质量控制部门可以只有一个人，而在大企业中质量控制部门的雇员人数会很多，而且质量部可以拥有很多小的分支部门。因此，对于质量控制部门以及其成员的称呼已变得不如其执行所需角色和职责的权利重要了。

法规规定质量控制部门至少有以下职责：

- 处置（批准或拒绝）成分、容器、封闭物、中间产物、包装、标签和成品药；
- 重新审查生产记录以确保无误；
- 如果发生错误，应进行充分调查；
- 批准或拒绝标准操作规程（SOP）及标准；
- 批准或拒绝变更；
- 监察合同生产操作（包括检验）；
- 批准或拒绝对生产药品的安全性、纯度、规格、质量和药效有潜在影响的行为。

FDA 希望（其他一些管理当局也如此）质量控制部门独立于其他部门。这样就最大限度地保证了质量控制部门的决定无利益冲突和障碍。通常，希望质量控制部门的领导者向公司的高层领导者汇报（首席执行官、主席、首席运营官等）时，不要出现向生产、营销或其他相同职能部门汇报的局面。

GMP 要求质量控制部门拥有一个合格的实验室，且必须是室内的，为部门的一部分；或者可以是其他承包人或其他公司的实验室。同时，也期望该实验室独立于生产部门和其他部门，以便能最大限度地保证数据的客观性。

2. 主要（批）生产和控制记录

关于主要生产和控制记录以及批生产和控制记录的特定要求分别在 CFR21 条 211.186 和 211.188 款都有描述，而且同样适用于临床用药品。不论如何要求，早期研发的批文件水平和数量一般来说远低于商业药品，直到生产过程非常完善。为临床而批生产和控制的记录多了备注、变化、批生产中的手写记录。这种外加的信息数量通常恰巧与药物研究阶段相关（比如，早期生产，更多的记录和变化），它包括以下几点：

- 生产中出现的任何情况的记录；
- 发生的问题；
- 处方的变更、操作步骤、工艺参数或设备参数的变更。

这种执行主生产和控制记录的信息应当被评估、复审，如果需要的话还要被批准，并利用建立的变化控制系统加以整合。

在很多情况下，临床用药品的主生产和控制记录通常为硬纸，并标上颜色（如蓝色或绿色），以表示是研发生产操作，而不是商业生产操作。

3. 厂房和车间

厂房和车间不但要使被批准的药品和临床用药品均维持在良好状态,而且要有合适的大小和结构,这些区域要求提供的保护级别取决于各自区域的生产行为。例如,无菌灌装区域还需要高效粒子过滤空气、温度和湿度调节以及 100 级(A 级)洁净度^[5],即使是一期临床样品也不适合在没有环境控制或低于 100 级洁净度的实验室里灌装。后面将会提到临床用药品和被批准药品的无菌保证只存在细小差别或根本没有差别^[6]。在药品分装、混合、包装时都应实行无菌操作,因为 FDA 要求生产临床用药品的厂房和车间要与生产商业药品的一样。

4. 设备

与厂房和车间一样,设备也要求具有合适的大小和结构,也要在合适的车间内进行操作、保养、清洁(CFR21 条 211.63 款)。法规对商业药品生产设备和临床用药品的生产设备的要求没有区别,如设备在使用一段时间后要要进行保养和清洁,测量仪器要校准、认证并按规定的操作规程操作,清洁是特别重要的,因为药品研发中的很多化合物都具有不明毒性,增加了用药的危险性^[7]。一般来说,一个完整的经过验证的清洁程序在一期和二期临床用药品生产中还没有完成。然而,实际上还是应该认真做好清洁工作,以降低污染或遗留产物的潜在危险。这项工作只需目视便可完成,或通过查证实际样品和分析试验进行。最后,CFR21 条 211.105 款要求生产临床用药品的设备要贴标签或状态牌,表明其生产的产品以及生产阶段和批号。

5. 进料管理

通常与进料相关的要求包括化合物、药包材和封闭物,还包括建立和遵循规定的程序接收、鉴别、储藏、处理、取样、检验和批准(或拒绝)进料(CFR21 条 211.80 款)。研发部门应建立一个接收机制和独立于商业生产的进料接收区域。与商业生产所要求的材料的体积和规模相比,研发使用的化合物、药包材、密封件、容器的数量少得多。

我们应当注意一点,即 FDA 希望临床用药品的进料应由质量部门放行。简化接收流程的行为是被禁止的。同样重要的是,要保证进料合适地储藏和隔离,这样待检的、放行的和拒绝的进料可以被识别出来,而且它们之间要有一定程度的隔离。不同批号的相同进料不能混合储藏,以避免生产中混用(CFR21 条 211.80 款)。

最后,用于生产临床用药品的化合物进料(如原材料)必须经过特殊的鉴别检验(如果可以的话)。每个化合物、药包材、密封件都应定标准并遵循(CFR21 条 211.84 款和 211.94 款) CFR21 条 211.E 关于组分、药包材、密封件的规定。本文没有介绍,但也适用于临床用药品的生产。

6. 确认与验证

通常厂房、车间、应用系统(如水、空气、净化系统、

压缩空气)、主要设备(包括实验室仪器)是需要确认的;生产过程和分析方法是要经过验证的。简而言之,确认(和验收)只是关于过程、行为或设备能重现达到预期标准和质量的书面证明^[9]。这一部分将着重于生产过程的验证要求,而厂房、车间和设备的要求以及净化系统的验证前面已经讨论过了。

FDA 指出,在研发工作中,其过程应当得到验证,并且应当是“尽可能的”。研发早期的挑战在于只能从很少批次的药品建立其物理化学特性(包括毒性和药效)、生产参数和对应的设备参数。同时,这还依赖于过程中监督和检验、一期和二期临床,可能的话也包括三期早期的成品检验。当多个批次不在相同条件下生产时,这种局部重点监督检验可以代替全过程验收。FDA 声称,一旦科研数据和文件达到一定程度,完整的生产过程验证将是必需的^[8]。

当早期临床用固体口服药品的混合次数和压片参数不能完整建立时,这些变量直接影响药物安全性的作用远小于细菌污染、内毒素污染或颗粒大小对灭菌的注射剂的影响^[6]。因为临床用药品的性质了解不完全,且经常用于体弱的患者^[7],其过程和相应的验证数据应早在一期临床供给生产时就确保患者的用药安全^[6,8]。

7. 生产和过程控制

CFR21 条 211.100 款要求建立并遵守成文的生产和过程控制程序。因为关于变更处理、偏差、设备标识的详细要求在本章其他章节中有过介绍,而且其 F 部分规定了其他条款保证临床用药品符合现行 GMP 标准,所以这部分将着重介绍 F 的其他部分,下部分规定了临床供给生产中的特殊要求。

生产统计不仅仅在 CFR21 条 211.103 款中有要求,它 also 提供了基于批次基础的过程、阶段或步骤连贯性的计量。在持续的研发过程、过程优化或在调查生产过程中的问题时,这种信息被证实是很有用的。实际产量与理论产量的百分数和很多重要计量中的一项常常被用来评估一个生产过程的有效性。

生产的时间限制可能不能完全了解透彻,或者在早期临床研究时就被制定出来。然而,一些对于时间敏感的操作,如混合所需的时间、干燥时间都应有实验数据支持。不考虑任何数据或操作经验而专断分配时间的行为应当避免,因为这可能会导致沉重代价的错误和生产延误。

返工可以被定义为为了获得预期目标而重复生产和控制记录中的步骤及顺序。在研发生产中应当建立并遵守返工的步骤和操作的书面程序。所有返工的有效性都应有验证工作来证明以及充分的数据来支持。

8. 无菌保证

FDA 在视察过程中,会着重检查他们认为相当重要的,且将会影响灭菌药品生产安全性和有效性的系统^[10],包括如下:

- 药品自身、组分、包材、与产品直接接触的设备、



表面的除菌过程；

- 除热原过程^[11]；
- 供水系统；
- 空气净化系统；
- 环境监测程序；
- 进料处理；
- 包装和标识操作；
- 实验室控制；
- 冻干（如果有的话）。

总的来说，以上提到的程序、系统和验证都应该适用于临床供给生产操作。这应该包括：①过程验证，如灭菌、除热原和冻干法；②验证供水和空气净化系统；③建立并遵守以下程序：环境监测程序、进料处理、包装和标识；④现行 GMP 关于原材料、中间体和最终成品的实验室分析规定；⑤环境监测支持临床供给生产的检验。另外，这些过程和行为都是与药品相关的（如灭菌、除热原、成品生产过程、原材料中间体和成品分析测试），这些过程应该尽可能地验证。比如说，在灭菌过程中，最后的湿热灭菌法以下所有都应进行验证和过程控制，以防使用该药品的患者承担细菌污染的风险。

- 仪器应进行确认、保养和校正；
- 腔体热分布研究；
- 特定产品和装载方式的热渗透研究；
- 生物指示器挑战性试验；
- 蒸汽灭菌的过程控制和检测，如时间、温度和压力^[6]。

相同原理可以应用于过滤除菌、干热除热原。在这种情况下或其他情况下，临床供给用药生产符合标准的程度与商业药品生产相比，没有或者只有很小的差别。

9. 变更控制

变更控制是 GMP 系统的一部分，在这方面，临床用药品生产和商业药品生产存在细小差别。GMP 中没有单独列出变更控制这一章节；然而，变更处理可以参考 GMP 的其他部分 [如 CFR21 条 211.1009 (a) 款和 211.160 (a) 款]。

在商业生产中，变更控制的目的是双重的：①保持被验证过的系统始终处于有效的状态；②保持呈送给管理当局的应用资料的准确度（NDA、ANDA、BLA 等）。

通常，在第三期临床用药品生产之前，其他临床供给的生产过程并不是不变的（也并不总是完全验证的），有时候直到第三期末的临床用药品生产才不变。所以，临床供给生产中的变更控制目标就有所不同，这些目标包括：

- 保证生产设备（包括计算机系统和软件）是经确认的（安装、操作、性能），且保持在确认状态；
- 支持系统（如生产注射剂的供水系统、空气净化系统、压缩空气、真空、洁净区等）保持在确认状态；
- 研究用新药中化学成分和生产及其控制的显著变更应被记录，并且在申请资料中说明这些变更；

• 处方、剂型的开发，生产过程、清洁过程和其他关键操作的主要变更均应作为开发过程记录在案；

• 当重复生产很多批次时（常常是在第三期临床试验时），将会评估变更，以评价该生产过程是否完善，是否符合验证标准。

10. 实验室控制

CFR21 条 211.160 款（实验室控制）及其分支部分的大部分，可以和商业生产一样应用于临床药品生产。有一个例外，即分析方法必须被验证的时间。对于化学成分或处方显著改变时，必须建立新的分析方法。与生产过程一样，这些方案已不再变化，否则很难或不可能使它像商业药品生产一样全部通过验证。

验证分析方法主要需要考虑的因素有：

- 专属性；
- 灵敏度；
- 线性；
- 重复性；
- 成熟性；
- 耐用性；
- 检测限；
- 定量限。

分析方法的验证应该与该方法的建立阶段紧密联系。然而，在开发周期完成前，对于该方法完整和透彻的验证是不现实的。一个例外是利用法定方法检验临床用药物（如药物的溶出度试验或释放度试验）。在这种情况下，药品公司必须做好准备，表明公司的实验室利用该法定方法也能得到重现的可接收的结果。最显著的区别在于，法定方法并不是一个完整的检测方法，它只是从整体协作过程发展而来的。因此，临床用药物的法定检测方法和商业药品的简便检测方法是差不多的。

超标调查方法应与商业生产所要求的一致。然而，大家认为，在很多情况下，标准也可能不太精确，其方法也有待改进。所以，要确定临床用药品不合格的起因是相当困难的。

当我们考虑临床用超标调查程序时，生产厂家必须有一个最基本的概念。这些基本概念包括：

- 不能仅仅因为出现意外结果影响成品的放行而武断地加以排斥；
- 必须考虑是否是操作失误、仪器不正常、试剂不合适或其他可以发觉的操作失误或与操作无关的错误引起了超标；
- 必须要有一个重新取样和重新检测的文件制度，包括说明要推翻超标结果而重新检测次数的合理性文件；
- 测试结果是不能被平均的，因为检验目的在于揭示批次的变化性（如混合一致性或含量一致性检测），平均结果掩盖了变化性；
- 如果使用了平均结果，超标结果必须与非超标结果一起给出，除非通过恰当的离群统计结果放弃（要求是法

定许可的或 IND 许可的统计方法)。

分析员的培训记录应该显示他们受过专业的培训与经验来从事被指派的工作。

稳定性试验按研究用新药的许可条例进行,而实施稳定性试验的方法应与上市药品的一样。例如(以下列表并不全面):

- 程序上保证正确地搜集稳定性试验样品,而且具有批次代表性;
- 程序上要保证试验室符合要求(温度验证)并控制好环境参数;
- 程序上要保证测试间隔的连贯性;
- 要有建立指示稳定性的分析方法程序;
- 要有所有检测完整的、清晰的、可得到的记录,包括保存的原始数据。

11. 偏差和错误调查

在商业药品生产中,产品或过程偏差,或者任何一个临床批次或其组分不符合质量标准,都必须经过规定程序处理和透彻的调查(CFR21 条 211.192 款)。调查报告必须包括以下内容:

- 错误及偏差的本质;
- 日期;
- 受影响的批次;
- 根本原因;
- 影响分析;
- 提出改正建议;
- 由质量部门批准。

偏差除了与产品和过程有关之外,还可能本质上是程序导致的,这意味着没有遵守标准操作规程。有时我们也用“非计划性”和“计划性”偏差这两个术语。非计划性偏差包括非意愿的事件、行为或行动。非计划性偏差的一个例子是在生产一批产品过程中出于安全性考虑关闭了处理设备。相反,计划性偏差是 FDA 不愿意看到的,是故意决定不遵循书面程序、生产说明或其他强制性法律要求,至少是现行的 GMP。FDA 期望所有的偏差都被详细而具体地记录下来,包括是谁做了什么决定。

在临床供给生产环境下,应当建立并遵守系统和程序,以便处理偏差和进行调查。对于偏差来说,也应包含趋势(或者根据定义的种类,如生产线的仪器设备、工艺等或其他预先定义的标准),及时地解决问题,并重新评估过程或设备的参数和标准、过程要求或其他有关成品质量或纯度的项目。这种重新评估在新药研究中特别重要,因为在新药研究中,关于被研究药物的信息以及生产方法、生产能力或测试方法的敏感性的信息很少。在这些情况下,不适当的或不正确的产品或过程特征的定义有可能导致人为的高偏差率,更重要的是,还可能导致该药物附加的产品开发工作。

12. 投诉与不良反应

GMP211.198 条提出要报告并调查顾客的投诉。这一

部分旨在保证当某一生产厂家通报了某一产品的缺陷时,必须对该缺陷的起因进行彻底的调查,而且必须考虑是否从市场上召回该药品。当然,这些行为都是为了保护患者免受有缺陷药品的危害。

如果有缺陷的产品只是用于临床试验,法规最主要的目的在于保护患者免受有缺陷药品的危害,这一点必须重点强调。然而,有缺陷药品数量、分布的限制都会影响投诉调查的进行。例如,本身用量很小的药品可能很难确认其生产缺陷的发生是否处于低水平上。有限而严格的临床用药品分发控制系统对于促进和限制召回行为是很有效的。

对于临床用药品的不良反应投诉,通常是影响试验药品安全性和有效性的报告事件。公司应该对药品强烈的不良反应和生产缺陷相关的可能性提高警惕。例如,一种产品如果在最终剂型中药效过强的话,很可能比正常制剂的不良反应更严重,发生频率更高。标签的混淆也会对患者造成严重影响,或者至少会影响临床试验的有效性。因此,以下因素必须包括在投诉评估系统中:

- 可以观察到的(物理的)投诉应进行迅速彻底的调查,以查明缺陷的根本原因和缺陷可能发生的范围。
- 罕见或严重的不良反应投诉,或显著的未预料到的不良反应数量激增(包括明显的缺乏有效性)都应被评估,以确定其是不是生产上的错误导致的。
- 当一个产品的缺陷被确定后,评估工作应该由一个资深人员(通常是一个医师)进行健康危害评估。FDA 的召回规定里还包括一个指定的健康危害评估题目(见 CFR21 条 7.41 款)。
- 产品缺陷投诉和不良反应数据和趋势应该定期比较,以确定在未预料到的例数、不良反应种类及严重程度、报告的产品缺陷的数量及种类之间是否有某种联系。
- 与商业药品一样,对于投诉、调查和解决方法要有详细的记录,以符合 GMP 要求。

13. 技术转让计划与报告

研发组织利用技术转让计划与报告来记录“正式”转让一项新开发的或最近改良的产品/工艺给操作单位,该操作单位通常位于一个独立的厂房,或者位于一个完全隔离完全不同的生产场所。虽然 FDA 并没有规定其格式和内容,公司的文件中通常包括以下信息^[12]:

- 确定关键部门的职责;文件审查、批准和储藏要求。
- 已完成的研究工作的总结。
- 扩大规模的总结;处方、合成、工艺、分析方法变更的总结;建立杂质的标准;确定关键工艺数据;确定验证计划和活动。
- 确定成分、包装材料和产品属性。
- 分析方法的建立和验证总结。
- 描述、质量标准、设计参数和对车间的要求,关键设备和公用系统。
- 确定生产工艺。

L

- 稳定性和有效期信息。
- 变更控制。
- 返工。
- 清洁程序，包括方法建立及程序和方法的验证。
- 法规事务活动总结，包括法律承诺、法律文件中总结的关键数据和信息。

14. 数据完整性

GMP数据的完整是公司工作的一个重要方面。“数据完整”通常意味着原始数据和相关的总结性数据及报告是可信的、精确的、清晰的、不能抹去的、完整的、容易获得的。数据可以是电子版的，也可以是书面的。GMP允许保存影印或经其他光学处理的数据；然而，原始数据应当尽可能地保存。

良好的临床用药品数据记录的基本要点应当与商业药品相同，具体如下：

- 数据及其可信性的证明应同期记录，或者在紧接着进行一个步骤或一次观察的时候记录。数据从一个格式转换到另一个格式的行为应当避免，如果发生的话应该要另外一个人确认其百分之一百准确，这样提高了数据的精确性。
- 书面数据应该用不能擦掉的墨水来记录。错误是不可避免的，当错误发生时，应在原来数据上划一条横线，首字母和日期、正确数据、简单的解释错误原因应根据文件要求和程序要求写。
- 数据必须始终记录在为特殊目的设计的表格中。其他零散的纸张（包括便签、纸片、纸巾等）在GMP规定环境中是严禁出现的。
- 日志、实验室笔记、批生产和控制记录、确认和验证方案和报告、偏差和错误调查和其他GMP文件都必须仔细分类、控制并存档，以方便将来调阅。
- 电子版记录（与电子签名，如果用了的话）必须遵守CFR21条第11部分。解释11部分已经超出了本文的范围，然而，一般原则是像书面记录一样精确并忠实于事实地建立并维持电子记录。每一个选择使用电子数据采集技术及电子签名的公司必须透彻地理解第11部分，并保证符合法律规定。
- 每一个公司必须制定严格的政策，禁止故意弄虚作假、毁损、删除或毁坏与GMP有关的记录。公司必须严格执行该项政策，并在错误被发现时采取严厉的惩罚措施。如果公司没有这样做，公司及其管理层可能会受到法律制

裁，包括违反《法案》的起诉，或违反美国刑法的起诉（《美国法典》18条）。即使是无意行为导致数据或记录丢失的情况也应当避免。但如果发生这样的情况，应进行及时全面的调查。

- 建立并遵守文件管理、数据舍入、重要数据、指导审计的政策和程序，以保证记录中或其他FDA要求的文件中数据的完整性。

参考文献

1. Human Drug CGMP Notes; FDA, CDER, December 1996.
2. Human Drug CGMP Notes; FDA, CDER, September 1999.
3. Human and Veterinary Drugs, Current Good Manufacturing Practice in Manufacture, Processing, Packaging or Holding. Federal Register 1998, 43 (190), 45013—45336.
4. Human Drug CGMP Notes; FDA, CDER, June 1994.
5. Code of Federal Regulations, Food and Drugs; Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals, Title 21, Part 211; August U. S. Printing Office; Washington DC, August 1996.
6. Levchuk, J. FDA Perspectives on Production of Parenteral Clinical Supplies; International Good Manufacturing Practices Conference, Mar University of Georgia; Athens, GA, Mar 5, 1997.
7. European Commission, Enterprise Directorate General. Good Manufacturing Practices, Annex 13, Manufacture of Investigational Medicinal Products, Vol. 4; November 2001; Draft 1.
8. Guideline on the Preparation of Investigational New Drug Products; FDA, CDER, March 1991.
9. Guideline on General Principles of Process Validation; FDA, CDER, May 1990.
10. Compliance Program Guidance Manual, 7356.002A, Sterile Drug Process Inspections; FDA, CDER, October 1990.
11. Guideline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing; FDA, CDER, June 1991.
12. Tetzlaff, R. Preparing for an FDA Pre-approval Inspection; March Parenteral Drug Association; San Diego, CA, 1997; 20—21.

（吴小虎 陈阳 译）

流化床制粒

Yoshinobu Fukumori

Hideki Ichikawa

Kobe Gakuin University, Kobe, Hyogo, Japan

引言

人们已经采用流化床装置进行干燥、制粒和包衣。除了简单的流化床外,能翻滚、搅动、离心和螺旋流动的流化床和有或没有导流管的喷动流化床都已开发用于改良工序的性能。通过简单的流化床生产出来的颗粒通常具有柔软和多孔的特性。这有利于压片过程,因为颗粒容易变形会导致片剂硬化。流化床也成功地应用于药物粒子(包括附聚物和晶体)的包衣。在多种表面修饰方法中,流化床具有简易和自动在粒子表面进行多层包衣的特性。为了有效传输药物,已出现多种实用的制药颗粒系统,包括肠溶-包衣微粒和缓控释释放系统。

在药剂学领域已确立并得到广泛应用的这些制粒和包衣技术,已延伸到其他领域,如食品工业和农业。然而,现在的流化技术可以加工的粒子尺寸有一个限定范围^[1]。将颗粒的尺寸限制到较小的范围,流化床将会有更广泛的应用。以下将从实际应用方面描述流化床方法。

流化床装置

图1介绍了典型的流化床装置。图1(a)是一种简单

的流化床,通常室底部为圆锥形,致使喷出粒子的流动或多或少取决于锥形室的角度。在制粒过程中,喷雾从流化床的顶端喷入,而在包衣过程中则从切线的方向喷入。从流化床逃逸的颗粒大部分由滤袋捕获,并且通过周期性抖动使颗粒回到流化室内,在制粒过程中,这个过程可以中断也可以不中断流化空气输入或喷雾,但在包衣的过程中通常是不中断的。图1(b)是一个典型的翻转流化床例子。图2介绍了自动操作的翻转流化床。流化空气经过转盘和流化室间的狭缝进入。翻转迫使粒子因离心作用流向流化室壁;然后,粒子被空气吹起。这些组成了循环流化床,通过顶部喷雾或切向喷雾模式,湿粒子能在转盘上滚圆和紧实。图1(c)是一种典型的 Wurster 工艺装置,一种配有导流管的喷动流化床。在导流管 and 主室间的环形部分流化的粒子由于从底部进来的加速气流而吸入导流管内,然后从导流管内喷出。粒子的速度在上面的膨胀室内减慢,致使粒子回落到环形部分的流化床。在循环粒子流动过程中,粒子在导流管中喷雾,同时受到空气喷射。空气喷射能对颗粒施加强大的分隔力。通常,粒子在喷雾的过程中容易成团块或凝结,但是上述的强空气喷射能使粒子分离。Wurster 工艺的这些特性相比于其他类型的流化床,能更好地进行更小粒子的包衣^[2]或生产出更小的粒子^[3]。

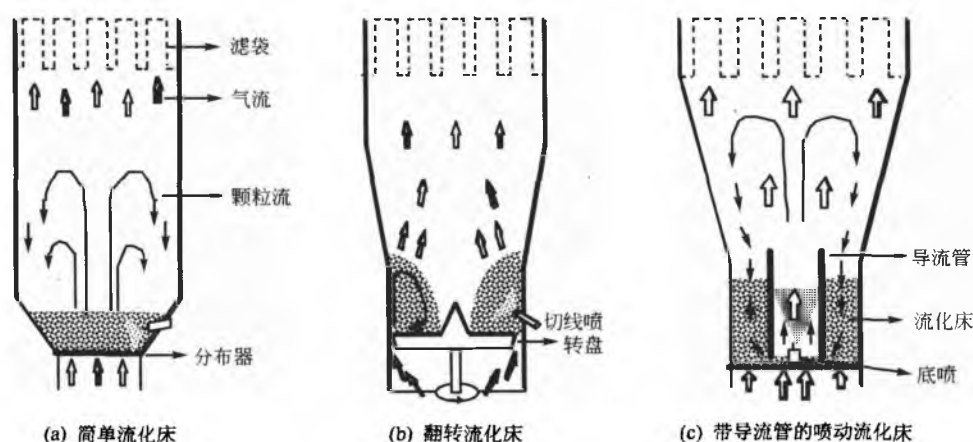


图1 典型流化床的示意图

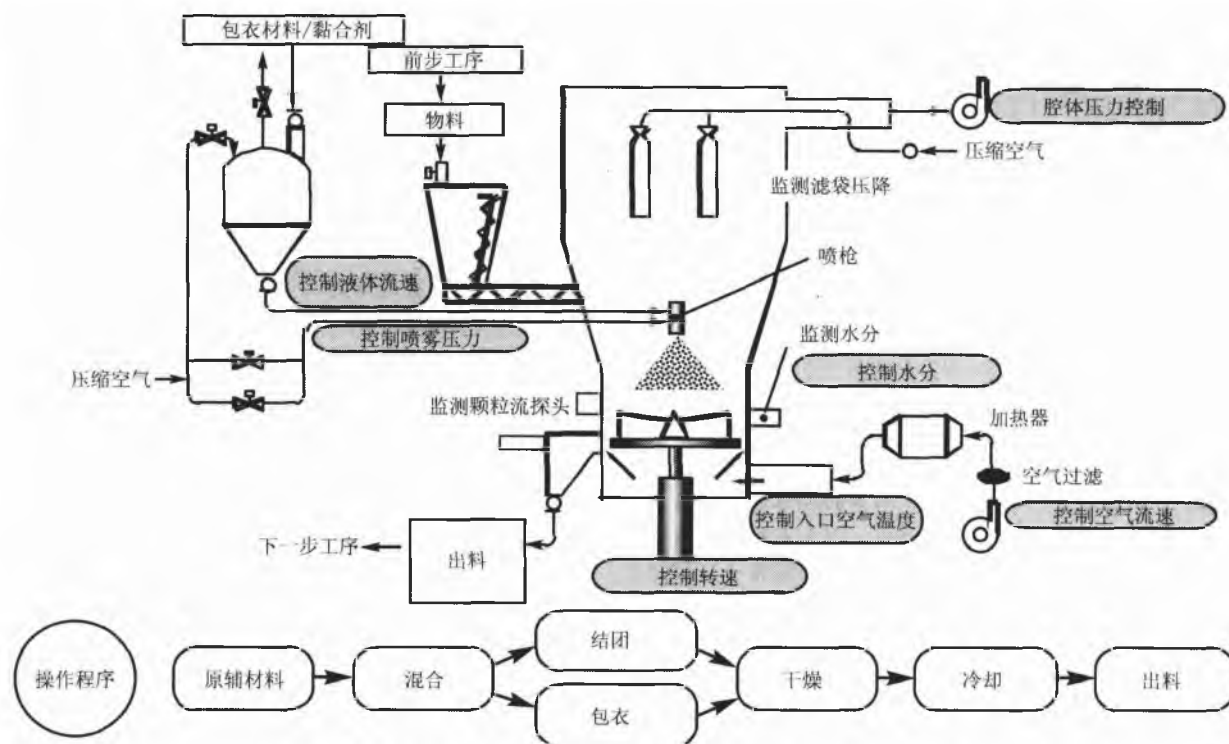


图2 自动操作的翻转流化床装置 (Agglomaster, Hosokawa Micron Corp.)

Geldart 提出的流化类型^[4], 根据粒度和密度划分。因为药用粉末的粒子密度大概为 $1.5\text{g}/\text{cm}^3$, 粒子分类为: 大于 $900\mu\text{m}$, D型; $50\sim 900\mu\text{m}$, B型; $20\sim 50\mu\text{m}$, A型; 小于 $20\mu\text{m}$, C型 (Geldart 流化图提到的粒子)。A和C型粒子具有内聚性和附着性, 因此制成B和D型颗粒以获得更好的流动性, 这是制粒的主要目的。D型粒子因为粒径太大而不能流化, 因此只采用旋转包衣锅进行包衣。B型粒子总是表现出沸腾流化, 从而产生非均匀的粒子流动。这些是不利条件, 因为在喷雾区的这种流动会导致包衣性能低以及产品的不均一性。为了使B型粒子能形成均匀流动, 需要不同于简单流化床的流动模式, 如在翻转、离心和螺旋流化床以及喷动流化床中所采用的。这就是至今为止开发许多不同类型流体床的原因。A型粒子可以在不沸腾的状态下均匀流化, 但是流化的分离力不足以避免凝聚。这妨碍了流化床包衣在工业上应用于这些小粒子, 尽管许多研究尝试了小粒子包衣技术。C型粒子由于尺寸小而不

能流化。

当粒子在喷雾下流化或喷出时, 喷雾溶液不同程度附聚粒子施加了分离力。分离力和黏合剂或包衣材料的黏合力之间的平衡决定附聚程度, 即颗粒大小^[5,6]。每种流化床都能产生其固有的分离力, 依赖于操作条件, 如气流模式和进口气流速率。过大的分离力甚至能碎裂颗粒核芯。因此, 在实际应用中应根据包衣的最终颗粒或颗粒核芯的大小采用最佳的流化床。

制粒和包衣的材料

表1列举了制粒和包衣所采用的典型的黏合剂和包衣材料。水溶性聚合物常用作制粒的黏合剂, 而其中的一些也用作包衣材料。因为水溶性聚合物的相对分子质量越高, 溶液黏性和粒子间黏合力越大, 从而促进了制粒和包衣过程中粒子的增大^[5,6]。

表1 黏合剂、包衣材料和核芯

类型	商标	供应商	溶剂	可溶于	主要成分
喷雾溶液	Kolidon VA64	BASF	水	水	6:4 聚 (VP/VA)
	Kolidon 20, 30	BASF	水	水	聚维酮
	欧巴代	Colorcon	水	水	水溶性聚合物、增塑剂和色素混合物
	TC-5	Shin-Etsu	水	水	羟丙基甲基纤维素
	HPH-H, M, L, SL, SSL	Nippon Soda	水	水	羟丙纤维素
	CMEC	Freund	水-乙醇	肠	羧甲基乙基纤维素
	HPMCP	Shin-Etsu	水-乙醇	肠	羟丙基甲基纤维素酞酸酯

续表



类型	商标	供应商	溶剂	可溶于	主要成分
喷雾分散体	Eudragit E100	Rohm	有机溶剂	胃	聚 (BMA/MMA/DAEMA)
	Eudragit L/S	Rohm	有机溶剂	肠	聚 Poly (MMA/MAA)
	Eudragit	Rohm	不溶	(不溶)	1:2:0.1/1:2:0.2
	RS100/RL100				聚 (EA/MMA/TAMCl)
	EC N-10F	Shin-Etsu	水	不溶	乙基纤维素粉末
	Aquacoat	FMC	水	不溶	乙基纤维素伪乳液
	Surelease	Colorcon	水	不溶	乙基纤维素伪乳液
	Eudragit RS30D	Rohm	水	不溶	1:2:0.1 聚 (EA/MMA/TAMCl) 伪乳液
	Eudragit RL30D	Rohm	水	不溶	1:2:0.2 聚 (EA/MMA/TAMCl)
	Eudragit NE30D	Rohm	水	不溶	2:1 聚 (EA/MMA) latex
	Aqoat	Shin-Etsu	水	肠	羟丙基甲基纤维素醋酸琥珀酸酯
	Kollicoat MAE30D/DP	BASF	水	肠	1:1 聚 (EA/MAA)
干粉末	Eudragit L30D	Rohm	水	肠	1:1 聚 (EA/MAA)
	Lubri wax 101/103	Freund		不溶	氢化蓖麻/油菜油
	Polishing wax	Freund		不溶	巴西棕榈蜡
核芯	PEP 101	Freund		不溶	聚 (氧乙烯/氧丙烯)
	Nonpareil 101/103/105	Freund			蔗糖-淀粉/蔗糖/乳糖-微晶纤维素颗粒
	Celphere 102/203/305/507	Asahi Kasei			微晶纤维素颗粒

注: BMA 表示甲基丙烯酸丁酯, EA 表示丙烯酸乙酯, DAEMA 表示甲基丙烯酸二甲胺乙酯, MAA 表示甲基丙烯酸, MMA 表示甲基丙烯酸甲酯, TAMCl 表示三甲铵乙基甲基丙烯酸氯化物 (trimethylammonioethyl methacrylate chloride), VA 表示乙酸乙烯, VP 表示乙烯苄基吡咯烷酮。

市场上可得到的广泛用作包衣材料的聚合物分散体,按制备方法可分为三类^[7]: ① 通过乳化聚合合成的乳液; ② 通过乳化过程如乳化溶剂蒸发、相转变和改变溶剂得到的伪乳液; ③ 微粉化聚合物粉末分散体。

Eudragit L30D 和 NE30D 是通过乳化聚合合法制备的丙烯酸共聚物^[8]。这些乳液的粒径在亚微米级别。L30D 是丙烯酸乙酯 (EA) 和甲基丙烯酸 (MA/EA 1:1) 的共聚物。由于共聚物存在羧基而用于肠溶包衣。NE30D 是一种只含有酯成分的共聚物, EA 和 MMA (2:1)。NE30D 所形成的薄膜软化温度很低, 因此在室内条件下也具有柔韧性和扩张性。

纤维素衍生物不能在乳液中直接合成, 因此制备成伪乳液 (Aquacoat、Aquateric^[9] 和 Surelease^[10]) 或微粉化粉末 (HPMCAS^[11] 和 EC N1-10F)。伪乳液能做成亚微米级微粒, 微粉化粉末平均粒径为几个微米。VAP 也以微粉化粉末的形式供应 (Coateric)^[10]。Eudragit RS 和 RL 是由 EA 和 MMA 作为酯的部分、TAMCl 作为亲水性季铵盐的三元共聚物。RS 和 RL 分别为 1:2:0.1 和 1:2:0.2 (EA/MMA/TAMCl)。因为 Eudragit RS 和 RL 富含 MMA 酯成分 (EA/MMA 1:2), 在室内条件下比 NE30D (EA/MMA 2:1) 具有更高的软化温度, 并形成坚硬的膜。在没有添加剂的情况下, Eudragit RS 和 RL 粉末通过在热水中乳化能很容易地转变成伪乳液^[8]。在世界范围内运送水分散体是昂贵的, 因此 Aquateric 伪乳液制成喷雾-干燥粉末供应, 在使用前重新分散^[9]。

多种辅料添加到分散体中, 作为表面活性剂 (吐温 80、月桂基硫酸钠、聚氧乙烯壬基苯醚、十六烷醇和普朗尼克 F-68)、增塑剂 (二丁基癸二酸酯、油酸和 Myvacet 9-40)、色素、抗黏剂 (烟雾硅胶)、抗凝剂 (Myvacet 9-40)、防腐剂 (山梨酸) 和稳定剂 (氨)^[7]。图 3 描述了水分散体的薄膜形成过程。水分散体的薄膜形成机理已经讨论了很长一段时间, 并且提出了许多理论。Muroi 从基本观点上综述了各种理论^[12]。Lehmann^[8]、Steuernagel^[9] 和 Fukumori^[7] 讨论了药用途径薄膜的形成理论。在包衣过程中聚合物的融合和薄膜形成可用水中混悬颗粒的湿烧结理论解释, 用毛细管压力理论解释不同水饱和度和粒子层的情况, 用干烧结理论解释干粒子层的情况。

粒子设计及制备

图 4 表示制粒过程生产颗粒的典型结构。简单的附聚 [图 4 (a)] 需在流化床中混合药物细粉和辅料细粉, 然后从简单流化床顶端喷射黏合剂溶液 [图 1 (a)], 再干燥。在这种情况下, 因为粒子在流化气流中附聚, 通常它们是多孔的。如果需要更为紧实的粒子, 可以采用翻转流化床或配有导流管的喷动流化床 [图 1 (b) 和 (c)]。当药物细粉与粗糙粒子载体 (表 1 中的核芯) 附聚的时候, 就能制备图 4 (b) 显示的药物分层附聚物^[13]。通常使用翻转流化床, 因为转盘的翻转有利于细粉的分层。药物分层附聚物常用于包衣过程中的核心颗粒。

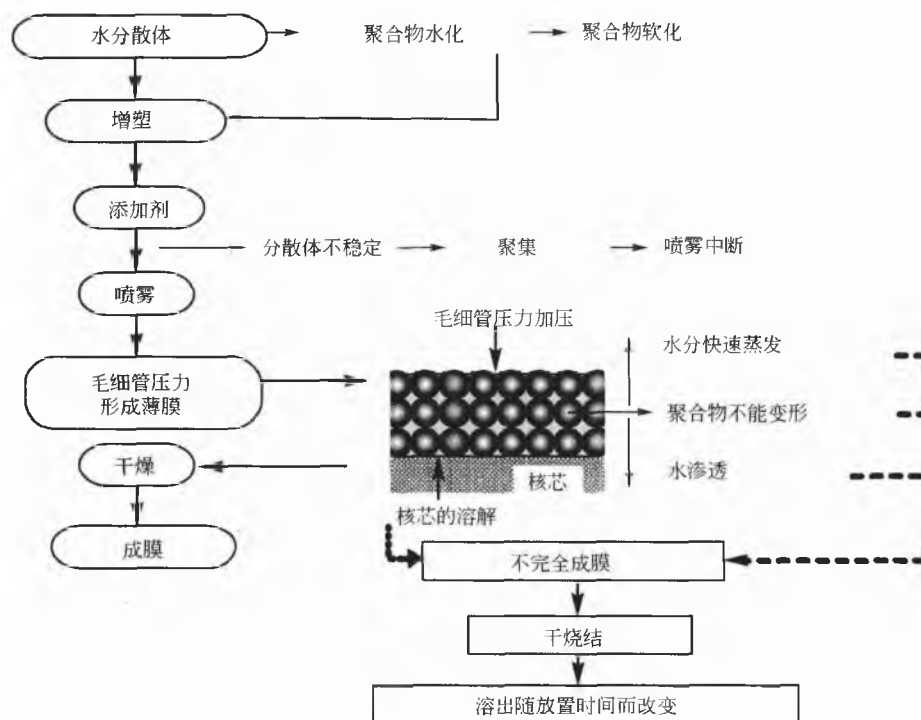


图3 聚合物水分散体的薄膜形成

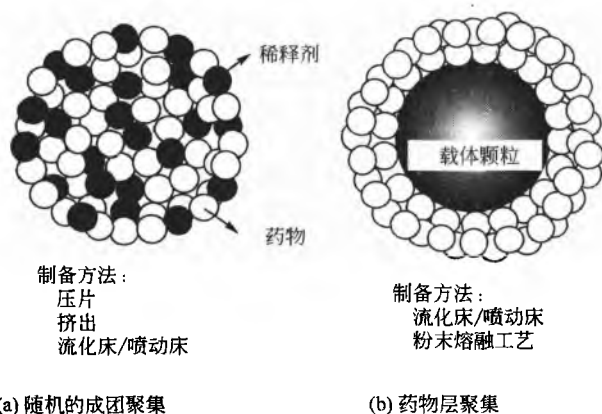


图4 颗粒的结构

在众多的表面修饰方法中，流化床最容易生产出每层独立的多层粒子结构、随机多相结构、有序多相结构等（图5）。组合不同成分和层几乎能生产出无数种功能性粒子。例如，下面讨论的热敏型控释颗粒的设计和制备。

基于外界温度激活释放的控释技术能应用于不同的工业领域^[1,14~16]。例如，药学领域利用病原体和热源引起正常体温（37℃）偏移，诱发治疗药物从温敏型控释系统中释放。使用体外热源如微波，与癌局部的升温处理结合也能用于温度激活抗肿瘤药物的释放。

温敏型控释微囊的膜由任意混合 Aquacoat（表1）组成，以聚（EA/MMA/2-羟甲基丙烯酸丁酯）为核芯和聚[N-异丙基丙烯酰胺（NIPAAm）]为壳。图5显示了具有随机两相结构的膜的例子。发现微囊可温敏性释放水溶性

药物^[17]。图6解释了机理。当温度在30~50℃逐步变动时，微囊表现出“开启-关闭”的脉冲式释放。这种“开启-关闭”响应是可逆的。

此外，这种温敏型微囊也可用其他已证实的药用辅料制备。众所周知，羟丙基纤维素（HPC），是一种普遍使用的黏合剂和包衣基质（表1），其临界溶液温度（LCST）在44℃附近，离开LCST时水溶性发生明显变化。具有HPC层的被动温敏型药物释放微囊可以利用这种由LCST现象产生的温控可逆性溶解/沉淀过程制备^[18]（图7）。这是具有多层统一结构的微粒的情况（图5）。当温度接近LCST时，具有三明治式HPC层的微囊释放速率大幅减少；50℃时的释放速率大约为30℃时的1/10。相反，微囊外没有包裹乙基纤维素的不表现出被动温敏型释放：药物释放速率随温度的升高而增大。

不像目前已有的多种毫米级装置，在这里提到的微粒直径为100μm左右，估计的膜厚度只有几十微米。将这种小尺寸温敏型材料包入微囊膜，能对温度变化产生尖锐的释放速率变化。这可能就是微粒包衣技术的优点之一。上述膜结构设计比传统的微囊化方法更灵活。

结论

如本章证明的，采用流化床技术和装置连同适当的材料、精心设计的处方和粒子结构能制备功能强大的粒子。然而这种方法具有不可避免的粒子大小限制，因为使小于20μm的粒子保持稳定的循环或流化依然是困难的。为了扩大流化床的应用，需要一些新的或改良的流化技术。

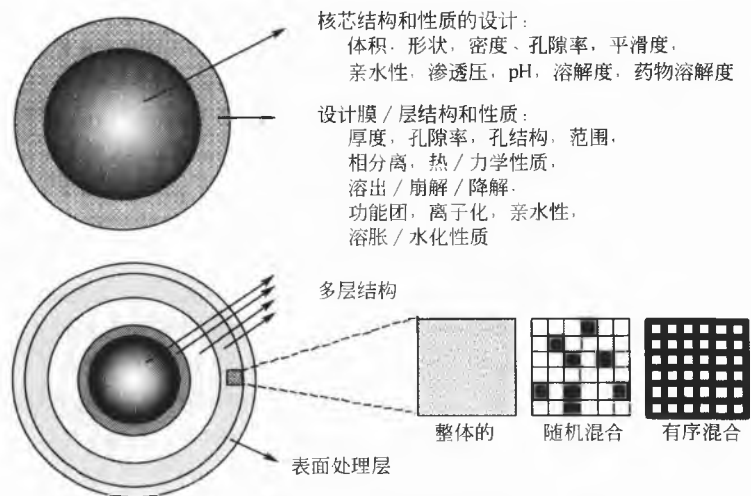


图 5 流化床生产颗粒的结构

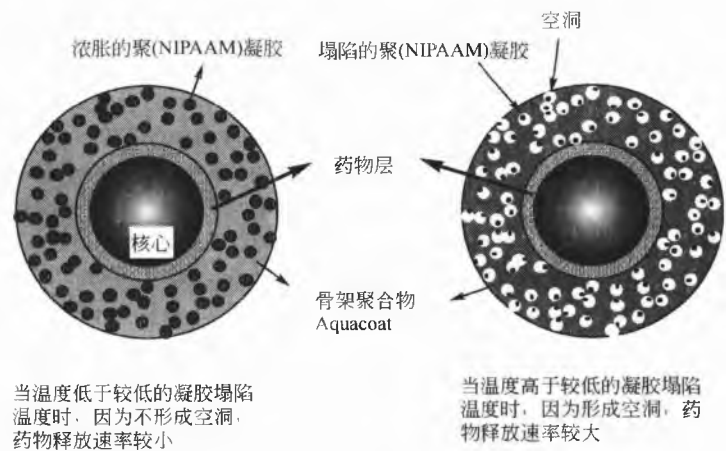


图 6 利用聚(N-异丙基丙烯酰胺)的凝胶塌陷效应制备被动温敏型释放药物的粒子的结构示意图

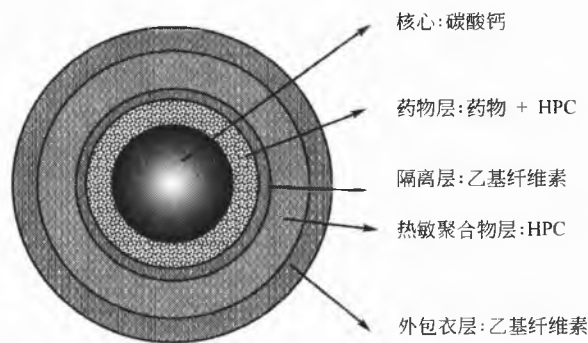


图 7 被动温敏型药物释放的粒子

参考文献

1. Jono, K.; Ichikawa, H.; Miyamoto, M.; Fukumori, Y. A review of particulate design for pharmaceutical powders and their production by spouted bed coating. *Powder Technol.* 2000, 113, 269—277.
2. Ichikawa, H.; Tokumitsu, H.; Jono, K.; Osako, Y.; Fukumori, Y. Coating of pharmaceutical powders by fluidized bed process. VI. Microencapsulation using blend and composite latices of copoly (ethyl acrylate-methyl methacrylate-2-hydroxyethyl methacrylate). *Chem. Pharm. Bull.* 1994, 42 (6), 1308—1314.
3. Ichikawa, H.; Fukumori, Y. Microagglomeration of pulverized pharmaceutical powders using the Wurster process. I. Preparation of highly drug-incorporated, sub-sieve-sized core particles for subsequent microencapsulation by filmcoating. *Int. J. Pharm.* 1999, 180, 195—210.
4. Geldart, D. Types of gas fluidization. *Powder Technol.* 1973, 7, 285—292.
5. Fukumori, Y.; Ichikawa, H.; Jono, K.; Takeuchi, Y.; Fukuda, T. Computer simulation of agglomeration in the Wurster process. *Chem. Pharm. Bull.* 1992, 40 (8), 2159—2163.
6. Fukumori, Y.; Ichikawa, H.; Jono, K.; Fukuda, T.; Osako, Y. Effect of additives on agglomeration in aqueous coating with hydroxypropyl cellulose. *Chem. Pharm. Bull.* 1993, 41 (4), 725—730.
7. Fukumori, Y. Coating of Multiparticulates Using Polymeric Dispersions. Formulation and Process Consideration. In *Multiparticulate Oral Drug Delivery*; Ghebre-Sellassie, I., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1994; 79—111.
8. Lehmann, K. O. R. Chemistry and Application Properties of Polymethacrylate Coating. In *Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms*; McGenity, J. W., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1989; 153—246.
9. Steuernagel, C. R. Latex Emulsions for Controlled Drug Delivery. In *Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms*; McGenity, J. W., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1989; 1—62.
10. Moore, K. L. Physical Properties of Opadry, Coateric, and Surelease. In *Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms*; McGenity, J. W., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1989; 303—316.
11. Nagai, T.; Sekikawa, F.; Hoshi, N. Applications of HPMC and HPMCAS Aqueous Film Coating of Pharmaceutical Dosage Forms. In *Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms*; McGenity, J. W., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1989; 81—152.
12. Muroi, S. *High Polymer Latex Adhesives*; Kobunshi-Kankokai: Kyoto, Japan, 1984.
13. Fukumori, Y.; Yamaoka, Y.; Ichikawa, H.; Fukuda, T.; Takeuchi, Y.; Osako, Y. Coating of pharmaceutical powders by fluidized bed process. II. Microcapsules produced by layering of fine particles and subsequent aqueous enteric coating. *Chem. Pharm. Bull.* 1988, 36 (4), 1491—1501.
14. Kaneko, Y.; Sakai, K.; Okano, T. Temperature-Responsive Hydrogels as Intelligent Materials. In *Biorelated Polymers and Gels*; Okano, T., Ed.; Academic Press: Boston, 1998; 29—70.
15. Ichikawa, H.; Fukumori, Y. New applications of acrylic polymers for thermosensitive drug release. *STP Pharma* 1997, 7 (6), 529—545.
16. Peppas, N. A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000, 50 (1), 27—46.
17. Ichikawa, H.; Fukumori, Y. A novel positively thermosensitive controlled-release microcapsules with membrane of nano-sized poly (N-isopropylacrylamide) gel dispersed in ethylcellulose matrix. *J. Controlled Release* 2000, 63, 107—119.
18. Ichikawa, H.; Fukumori, Y. Negatively thermosensitive release of drug from microcapsules with hydroxypropyl cellulose membranes prepared by the Wurster process. *Chem. Pharm. Bull.* 1999, 47 (8), 1102—1107.

(潘峰译)

酶联免疫测定法及相关生物分析法

John W. A. Findlay

Pharmacia, Skokie, Illinois, U. S. A.

Ira Das

St. Louis, Missouri, U. S. A.

引言

酶联免疫测定法,一种将捕获待测物的抗体抗原反应和检测被捕获待测物的酶报告系统相结合的生物分析方法,是使用最广泛的免疫测定模式之一。这种方法有时只能用于定性判断基质中是否存在抗原。然而,在更常见的定量应用中,利用校正曲线,通过插值法得到未知样品中待测物的浓度。从 Yalow 和 Berson^[1]首次采用放射免疫测定法测定胰岛素以来的几十年中,免疫测定法已经广泛应用于医学实践和药物开发中。然而,最近几年,免疫测定法在低相对分子质量生物异源物质中的定量应用已经大大减少,这主要是由于液相色谱-质谱(LC-MS)方法的出现,后者具有极高的灵敏度和专属性。这在药物的早期开发过程中尤为明显,采用 LC-MS 法,含量测定方法开发时间可以短至一天,每个样品的分析时间仅需几分钟,使研发人员能够快速获得分析结果。抗体独特的专属性使得其在免疫测定法中的应用能够成为三期和四期临床试验中替代 LC-MS 法的一种经济方法。此外,这些方法仍然广泛用于治疗药物监测和低相对分子质量激素,如甾体化合物的分析、辅助医学诊断。在复杂基质中的蛋白质大分子和抗体定量分析中,免疫测定法仍可作为一种选择。免疫测定法的另一种主要应用在于生物标记的检测和定量,这在候选药物的药理学、毒理学和临床活性评估中非常重要^[2]。

免疫测定法通常根据关键抗体结合试剂或者用于监测结合反应终点的检测报告系统的类型进行分类。这些不同类型的免疫测定法通常具有许多共有的特征,因此,本章将重点讨论酶联免疫测定法和其他类似的相关方法。酶联免疫测定技术在一些教科书、专论和综述文献中均有介绍,包括本丛书早期版本的一篇优秀的全面讨论^[3]。因此,本章不再深入介绍关于产生和处理作为试剂的抗体或者酶联免疫测定法的条件等机理。相反,本章的目的是从几个主要议题出发介绍这项技术,也就是:生物分析应用的范围;酶联免疫测定法和相关免疫测定法所强制要求的不同的、有时是附加的验证事宜;某些作为酶联免疫测定法补充的、能够增强其潜在性能的更先进技术。本章还涉及生物分析在生物流体中的前景,对酶联免疫测定法的其他应用不再详细介绍,比如过程控制或者产物释放,尽管这些主题在别处已经介绍过^[4]。

酶联免疫测定法的模式

酶联免疫测定法的模式是指常规应用中测定组分组合的结构。因为这种模式在测定法开发过程中已经建立,测定条件已经定义,所以在验证过程以及随后的样品分析应用中必须保持不变。酶联免疫测定法的模式主要分为两类,也就是非均相和均相。在非均相测定中,至少有一种关键试剂被固定在固体表面,在最终检测步骤之前至少存在一个“清洗”步骤。相反,在均相测定中,所有试剂共同存在于溶液中,在信号产生和检测前没有“清洗”步骤。两种测定类型均包括竞争性和非竞争性模式。在竞争性测定中,溶液中的标记和未标记抗原(待测物或者配体)之间直接进行竞争,或者某些情况下,固定的和溶解的抗原竞争数量有限的抗体结合位点。在非竞争性测定中,用于捕获和检测抗原的抗体结合位点没有限制,因为抗原与过量的被捕获抗体和酶标记检测抗体一起孵化。竞争性均相测定模式的一个例子是酶放大免疫测定(EMIT)系统^[5],酶标记抗原在溶液中与生物样品(或者校正标准和质控样品)中的未标记抗原直接竞争数量有限的抗体结合位点。反应终点通过分光光度法进行检测和定量,无需插入任何清洗步骤。这种测定模式见图 1。酶联免疫吸附测定法(ELISA)是一种非均相、非竞争性免疫测定法。在这种模式中,与待测物相反的主要抗体被固化在一种固体塑料表面,通常是一种多孔板中。生物样品被分配到多孔板中进行孵化。然后,被固化的抗体捕获待测物,多余的待测物则通过清洗加以去除。接着,抗原-抗体复合物通过与配对抗体和其底物的两步孵化作用被检测。首先,一种酶标记抗体对准被捕获的待测物,将已固化的抗原-抗体复合物夹在中间。在与合适的酶专属底物溶液的第二个孵化过程中,会生成一种有色(或者荧光或者化学发光)产物,通过分光光度法进行检测。这种测定模式见图 2。ELISA 也可以在竞争性非均相模式下建立,此时抗原被固化在多孔板中,在一级抗体中会产生被固化抗原与溶液中抗原之间争夺数量有限的结合位点的竞争,这种竞争在溶液中也同样存在。在固定的孵化期之后,多孔板被清洗,并用过量的酶标记二级抗体进行孵化(对准来自于生成一级抗-抗原抗体的免疫球蛋白)。在适当的清洗步骤之后,该竞争的终点通过与一种信号生成底物的孵化作用得到检测。这种测定模式见图 3。

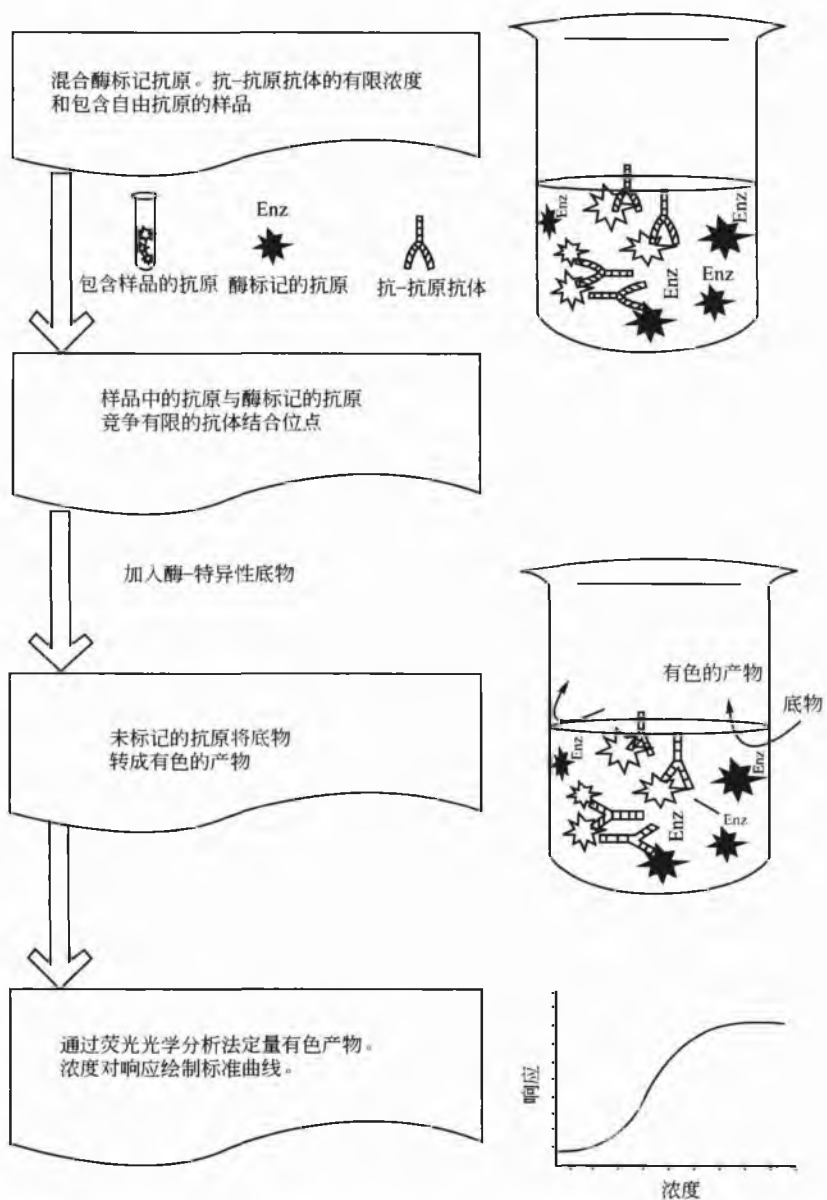


图1 酶放大免疫测定法的示意图

需要指出的是，最终信号输出与待测物浓度之间的关系（剂量响应）可能成正比，也可能成反比，这取决于测定模式。此外，也可以使用许多不同的报告酶（如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酯酶、 β -半乳糖苷酶），以及许多不同

的信号系统（如产生色谱或荧光或化学发光产物的底物、信号酶的激活、通过生物素-抗生物素蛋白或者聚合酶链反应进行的放大作用）。

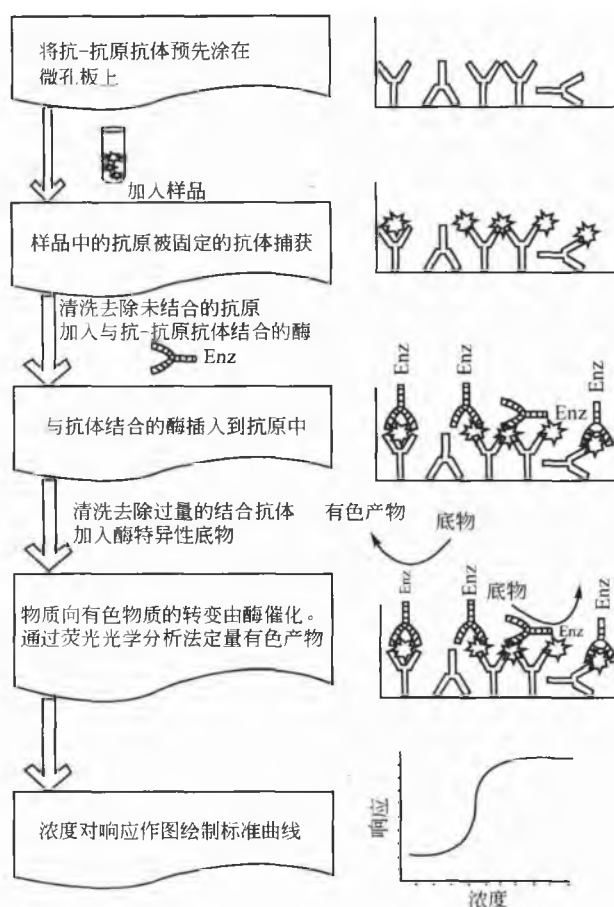


图2 酶联免疫吸附测定法的示意图

低相对分子质量待测物的酶联免疫测定法

LC-MS测定法具有灵敏度高、开发时间短等特点,它的出现削弱了采用免疫测定法测定低相对分子质量化合物的需要,尽管如此,后者具有的灵敏度、高通量和相对低成本等特点仍然使其在某些领域扮演着重要角色。在药物开发阶段,免疫测定法在某些方面仍然能够发挥其作用,比如生物标记物的评估或者肽类的测定,其中在测定前样品的清除方面,免疫测定法的价值优势还可能高于LC-MS法。此外,对于低相对分子质量的治疗候选药物来说,免疫测定法能够用于支持后期(三期和四期)的临床试验,此时代谢途径和药物用途已经得到明确。免疫测定法在低相对分子质量化合物分析中应用的关键是对应于待测物的抗体开发,这些抗体都具有明确的专属性。当低相对分子质量化合物(低于1000~2000)直接对动物给药时,通常不具有免疫性,或者只有微弱的免疫性。为了引起免疫反应,在免疫测定中必须产生合适的抗体,作为试剂使用,这些化合物在发生免疫作用之前必须与载体蛋白配对,如牛血清白蛋白(BSA)。关于这一主题已经有人进行过深入

讨论^[3]。被免疫动物的免疫系统对载体产生反应,接着对附着于载体中的半抗原(束缚于载体蛋白中的待测物类似物)产生二级反应。尽管通常会产生大量的载体蛋白抗体,但是它们可以通过如亲和色谱等技术轻易地去除^[6]。相反,待测物所需要的抗体也可能被亲和色谱分离得到,这样通过清除或者减少与有关物质,如代谢物或降解产物发生交叉反应的抗体的数量,也可能提高所需抗体的专属性。然而,在多数情况下,载体抗体在测定中不会干扰待测物的定量,因此,天然抗血清中的抗-抗原抗体在免疫测定中不需要进一步的纯化就能够使用。半抗原在载体蛋白上的附着点(可以通过适当化学偶合的功能基团直接附着于分子上,也可以通过制备获得的将化学偶合功能一体化的合成类似物附着于分子上)将决定获得抗血清的专属性。因此,在载体蛋白上半抗原的附着点时,必须考虑到被研究的化合物在动物体内代谢的已有认识,再做出明智选择。附着点附近的代谢产物将很难与母体分子区分开来,而远离结合位点的却很容易区分(也就是说具有最低的交叉反应力)。这种策略的最终结果是使用抗体的能力和最终可具有对手性药物对映体进行区分的测定^[7]。尽管偶合法通常涉及半抗原羧基或氨基(或其中的活性衍生物)与蛋白质中氨基或羧基之间的缩合反应,但是更新的配对法继续得到

开发。这包括二级双异官能团试剂的使用，如 *N*-(*m*-氨基苯甲酰)琥珀酰亚胺，首先形成一种肽类黏附于载体蛋白上，然后进行芳香氨基的重氮化，与含有咪唑、苯酚或者吡啶残基的合适半抗原发生偶合。其中一个例子就是促甲

状腺素与 BSA 的偶合^[8]。另一个例子是在雌二醇 3-氨基磺酸酯的一种 11- α -(3-亚磺酰丙基)酰半抗原类似物的制备过程中所涉及的甾体化学，其随后通过一种双异官能团交联物与牛血清丙种球蛋白发生偶合^[9]。

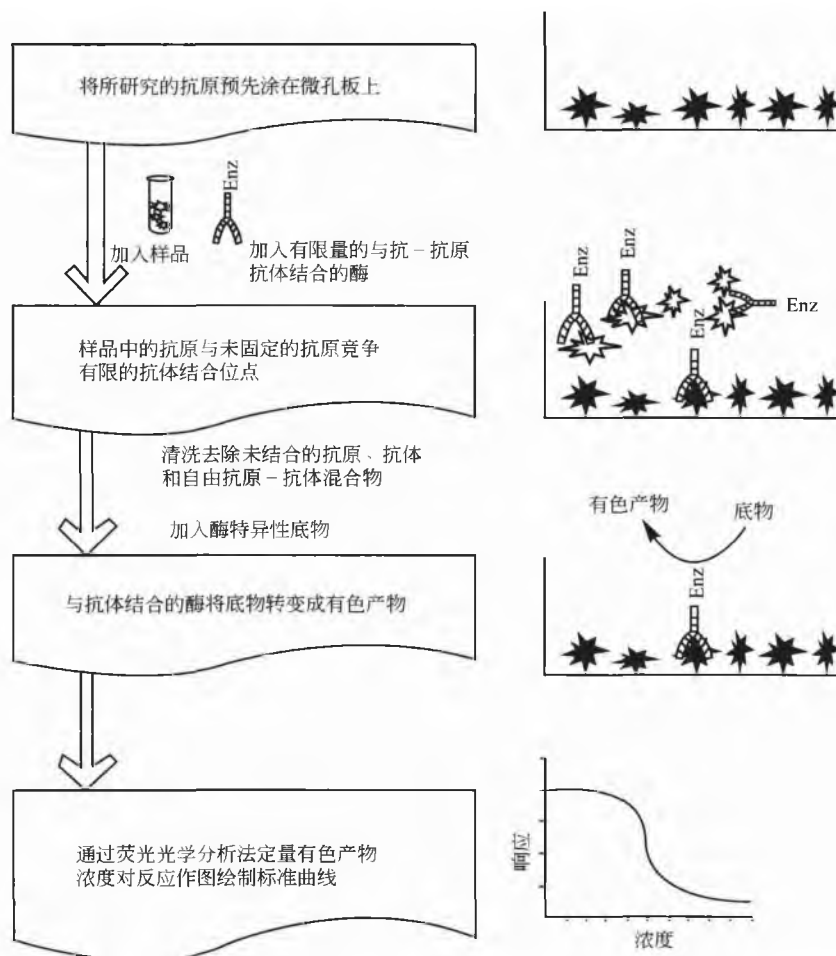


图3 竞争性酶联免疫吸附测定法的示意图

大分子的酶联免疫测定法

大分子的免疫测定法通常分为两类，也就是临床医学应用的内源性蛋白质测定（例如，促性腺激素或胰岛素的测定），或者那些新型基因工程蛋白质的测定。基因组学、蛋白质组学和重组技术的出现已经大大提高了我们对调控蛋白在疾病的发病机理和调节中所扮演角色的理解，导致了开发中的生物诊治数量飞速增长。几种调控蛋白已经开发出来作为治疗剂，有些已经进入市场。图4说明了这些试剂在许多不同诊治类型中的广泛分布，主要集中于癌症治疗领域。这些产品通常是内源性蛋白质的重组类似物，酶联免疫测定法开发的挑战结果是其专属性足以对天然分子和重组分子加以区分。

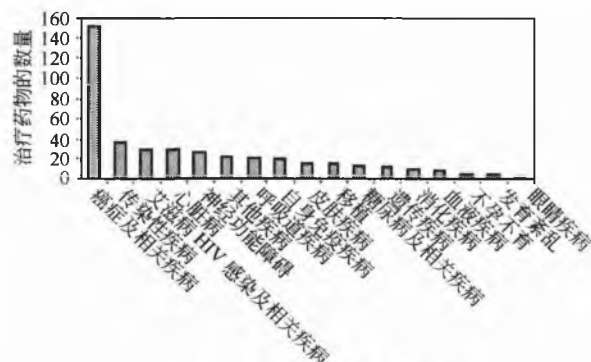


图4 开发中的生物技术产物

与低相对分子质量生物异源物质不同,大分子通常具有免疫性。免疫反应通常依靠称为抗原决定簇或者抗原免疫因子的分子上的几个位点得到引发。每个抗原中抗原决定簇的数量由分子的大小和复杂度决定。这些抗原决定簇可以成线性,由少到四个氨基酸以一定序列组成,也可以成一定构象,涉及分子在三维结构上的不同区域。如果所感兴趣的抗原在体内或者样品分析过程中破坏了其三维结构,那么使用对应于构象决定簇的抗体就可能产生问题。总的来说,大分子的测定模式至少使用两种抗体,与分子的两个不同区域发生反应。使用对应于分子不同区域的两抗,能够得到额外的专属性,可以将待测物从其代谢形式或者异构体中区分出来。

抗体的免疫测定法

开发中的许多新型生物制品是天然形成的人类蛋白质

的重组形式,或者是人类蛋白质的类似物,这些类似物的一级序列发生微小变化,或者在翻译后修饰的程度上存在差异。市场化的重组蛋白质包括激素(胰岛素、促红细胞生成素和生长激素)、酶(DNA酶、天门冬酰胺酶)、细胞因子(白细胞介素1、2、11,干扰素)、生长因子(G-CSF、GM-CSF)、凝血因子(Ⅷ因子)和疫苗(肝炎B)。一些其他的生物技术产品是新型的合成蛋白质,如依那西普(Enbrel®),而其他的仍然是诊治抗体,如莫罗莫那(Orthoclone OKT3)、阿昔单抗(ReoPro®)和曲妥珠单抗(Herceptin®)。动物和人服用这些重组蛋白质后可能会使其被主体免疫系统识别为“异物”,产生抗体反应。几种因素对这些分子的潜在免疫性发挥作用,包括蛋白质结构(包括翻译后修饰)、服用制剂中存在蛋白质片段或蛋白质凝聚体,以及可能与诊治剂同时纯化的细胞底物或介质组分。临床因素,如遗传背景、疾病状态或者免疫状况,以及给药途径和频率,也可能影响生物产品的免疫性。

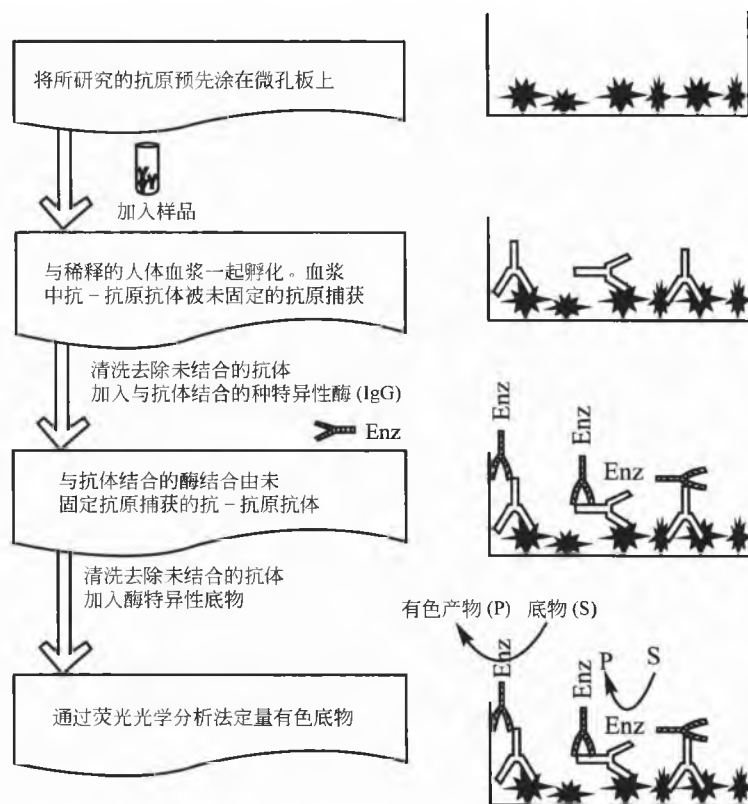


图5 抗原捕获抗体检测的示意图

在临床前和临床研究中,由于抗药抗体在网状内皮组织系统中能够捕获药物,消除诊治功能,或者通过Fc受体介导的摄取和破坏消除药物,为了准确评价其安全性、药动学和药效学反应,必须对服用药物的免疫反应进行评估。相反,如果药物-抗体复合物的分布或清除发生改变,也能够增强药效反应^[10]。诊治剂的抗体也可能与内源性蛋白质类似物发生反应,消除其活性,发生严重的不良反应。这

种抗体的存在也会干扰免疫测定法对生物基质中诊治剂的定量。此外,内源性蛋白质前抗体(自身抗体)的存在会使生物流体中分子定量和临床前、临床研究中安全性评估进一步复杂化。抗药抗体也可能在使用抗体时对成像和诊断程序产生干扰。例如,患者血清中进行鼠类抗体治疗的人抗鼠疫抗体(HAMA)可能在使用鼠类单克隆抗体的诊断测定中产生干扰。

中多次测定结果的比较,这涉及任一临床后遗症的评估。

生物标记的免疫测定法

生物标记定义为一种对疾病或毒性事件的体内生物响应。药理学标记是生物标记的一个子类,对药物干预产生响应,而替代标记是一类能够预知临床终点的标记。在临床环境中,生物标记可能对治疗干预显示出一种疾病响应。在制药工业中,正确选择的生物标记可以帮助进行化合物的选择,鉴别反应机制,预计剂量,论证功效,在难以获得足够灵敏的测定法的情况下,还能够代替直接的药理学评估。开发阶段的相关标记的确认可优化靶选择和验证工作,促进临床前的毒理学评估,明显缩短早期临床试验中论证试验所需的时间。合适生物标记测定的快速有效开展在药物开发过程中将节省大量财力。生物标记可以是生理学测定,如血压或心率、酶活性,或者是可定量的个别分子。生物标记可以是低相对分子质量待测物,也可以是大分子待测物。这些分子中许多(特别是大分子)是通过免疫测定法进行测定的,特别是酶联免疫测定法。

许多生物标记可以在血和尿中发现,其基础水平可低可高,这取决于标记的性质。因此,建立这些待测物的酶联免疫测定法所面临的挑战之一是获得无待测物基质,用来制备校正曲线和质控样品。合适的无待测物基质有时可以通过将待测物从基质中提取出来而制得,提取可以采用亲和色谱^[6]或活性炭吸附等技术,但是必须格外小心,以确保经处理的基质仍然能够代表被分析的基质。这一问题的替代方法包括使用来自于不同物质的同种类型基质,此时不存在内源性的生物标记;使用具有低浓度生物标记的混合基线样品或者使用一种含有缓冲物质的蛋白质。在这两种情况下,应当进行含有高浓度待测物、具有测定基质的研究样品稀释线性考察。尽管校正标准物质可以在替代基质中制备,但是只要有可能,质控样品应当在被分析基质中制备,这样才能反映出研究样品的测定性能。校正曲线的浓度范围应当尽量包括生物标记在生理(包括昼夜节律和个体间差异等因素)和病理状态时的可能浓度。质控样品的浓度水平也应当反映出生理和病理状态时的浓度水平。生理水平可能会受性别、种族、个体间差异、昼夜节律和季节差异等因素影响,而病理样品的水平可能会受疾病阶段、并发症、当前治疗情况和患者总体状态等因素影响。

开发生物标记测定法所面临的另一种挑战是性质良好的参比标准物质具有不一致的有效性。对于许多大分子生物标记,经纯化的专用参比物质是不适用的。如果可以,蛋白质通常不通过标准化方法表现其特点。对于相同批号的参比标准物质,抗体来源不同,也可能得到不同的结果。当参比标准物质或抗体的来源或批号发生改变时,建议使用标准品、质控混合样和一些研究样品进行交叉研究。交叉研究得到的数据将有助于对不同批号的试剂获得归一化的研究结果。此外,生物标记可能以多种形式存在,如异

构体,或者与同类分子中的其他生物标记存在同族关系。因此,免疫测定法可以用于测定所有非特定形式,也可以对专属性异构体进行定向开发。生物标记测定中所选用抗体的交叉反应性应当经过严格测试,考察其与其他异构体和同族分子之间潜在的交叉反应性。

酶联免疫测定法的验证

在过去的10~15年,生物分析法的验证已经成为越来越引起人们注意的一门课题。由美国食品药品监督管理局(FDA)、加拿大健康保护分部(HPB)、美国药物协会(AAPS)、欧洲药物协会联盟和《美国药典》(USP)共同主办的研讨会于1990年12月在弗吉尼亚州的阿林顿举行,会议对这一课题进行了讨论。这次后来称为水晶城会议的会议备忘录得到发表^[12],随后被用来作为生物分析法验证的非正式指导原则。

自1990年以来,生物分析法验证已经成为国际协调会议的讨论议题,同时也是FDA指导文件草案的主题^[13]。尽管色谱测定的许多验证内容也可以用于免疫测定验证,但是一些免疫测定法所独有的内容并没有被指导原则草案所刊载。最近,本章的作者与许多制药工业的同事们一起讨论了免疫测定法专用的验证问题^[14]。文献^[14]所覆盖的主题包括决定接受验证的质控样品的正确使用和测定验证的统计学问题。在建立验证的接受标准时,明确指明应当考虑到生物分析技术与其他方法的不同之处。最近几年,已经对免疫测定法验证的有关问题进行了评论,这些评论不仅广泛^[15,16],而且特别针对大分子的测定^[17]。在2000年,举行了两次会议,对生物分析法验证问题再次进行了全面讨论^[18],也特别讨论了大分子的测定,主要是免疫测定和细胞学测定^[19]。

对于任一生物分析法,免疫测定的验证范围应当与测定的预期应用相关。因此,如果免疫测定是为了支持研究开发阶段的快速筛选,那么方法的专属性、准确度和精密度等的验证可以用于支持临床前和临床开发研究更宽松。当然,为了检测活性代谢物和母体分子,可以设计出支持探索发现的测定方法,这样就可能对全部的正在流行的具有药理学活性的多种试剂做出评估。然而,在开发阶段,这种测定可能只适用于明确的交叉反应性的母体和活性代谢物。

免疫测定法不同之处及其对验证的影响

色谱测定和免疫测定之间的关键不同点是免疫测定中重要结合试剂的生物特性,也就是指抗体。当抗体在生物系统中产生时,批与批之间可能存在着差异,这对于多克隆抗体最为明显,因为多克隆抗体是在整个动物体内产生的。在体外生物系统中由单个细胞系产生的单克隆抗体在不同生产批次中表现出的差异相对较少。免疫测定法至少

M

存在一个定时孵化期,这意味着不同批次抗体试剂之间的结合亲和力和活动性差异会导致达到平衡的速率存在差异。免疫测定和色谱测定之间的另一个重要差异是免疫测定中使用待测物-蛋白质和抗体-蛋白质复合物。在验证过程中,应当考察这些重要试剂的稳定性,以确保其降解不会对测定性能产生负面影响。参比标准物质的有效性也可以区分色谱程序和免疫测定程序。因此,尽管对于低相对分子质量生物异源物质,性质良好的参比标准物质很容易得到,但是对于大分子免疫测定,有时却很难获得其类似物。高纯状态的大分子产物并不总是可用的,其性质通常由生物活性决定,而不是百分纯度。在一些情况下,来自于独立机构,如世界卫生组织经更广泛研究过的蛋白质可以作为参比标准物质。

在验证含意方面,免疫测定与大部分色谱测定的另一个重要差异是对于免疫测定,浓度与响应之间呈非线性关系。对于最佳的校正曲线,有时应适当包括高于和低于设定的定量限的校正点。校正曲线匹配的算法应当对实验数据进行全面评价,包括使用和不使用校正曲线渐近线区域内的附加标准点。总的来说,作者已经体会到使用渐近线区域内的附加标准点能够提高定量限处测定的准确度和精密度。FDA关于生物分析法验证的指导原则草案中并没有收载包括附加标准点的建议^[13],并指出校正曲线的最低和最高浓度点应当作为定量限。

对于免疫测定法,精密度、准确度和专属性等也会引起人们一些注意,进行不同的考虑。试剂和抗体-抗原反应的生物特性能够使免疫测定更加不精确,为了测定方法的真实精密度,可能需要次数较多的验证工作。精密度越差,测定不符合4-6-20规则的可能性越大,这种规则与方法执行的质量控制接受标准有关^[20,21],因此建议免疫测定的准确度限度应从20%放宽至25%^[14,19]。然而,由于许多免疫测定也能够达到色谱方法的精密度要求,因此在验证过程中,接受标准应当建立在已经验证的方法能力基础之上,而不是将所有免疫测定法都武断地设定为4-6-25。

尽管抗体的专属性很高,但是与色谱测定相比,这些试剂的生物特性也会为免疫测定带来一些新的专属性问题。在免疫测定中,复杂生物基质,如血清、血浆或尿中的待测物通常直接检测和定量(也就是说不需要先前的提取)。此外,如果研究样品中存在待测物的交叉反应代谢物,那么测定的专属性也可能会受到影响。免疫测定中的非专属性由多种不同来源引起,但是可以广义地分为“专属”和“非专属”的非专属性。专属的非专属性由与待测物物理化学性质相似的干扰物引起,包括代谢物、待测物的降解形式、杂质或者同时存在的药物。对于大分子,翻译后修饰蛋白质、蛋白质凝集物或者主体抗基因型抗体可能会以“专属”方式影响测定的专属性。非专属的非专属性由与待测物无关的多种因素引起,通常指基质效应。基质效应可能归因于溶血、高脂血、离子强度差异、pH、血清蛋白如补体或类风湿因子、抗凝血剂、结合蛋白、自身抗体或者异嗜性抗IgG抗体。非专属性干扰可能来自于校正标准物

质和质控样品制备时所选用的基质,或者研究样品本身。基质评价应当包括将添加(和未添加)基质中浓度-响应关系与缓冲基质中浓度-响应关系进行比较。用缓冲液进行稀释可以充分降低基质效应的强度,然而,如果这种方法无效,可能需要将样品清除或者将全部待测物从基质中提取出来。在这些情况下,为了避免测定中需要进行回收率校正,同等处理所有样品,包括校正标准物质、质控或验证样品以及研究样品则非常重要。

低相对分子质量生物异源物质和大分子免疫测定的验证内容

小分子免疫测定验证的首要步骤是验证待测物的专属性。已知代谢物、同时存在的其他药物以及某些情况下的内源性分子的测定干扰物质(交叉反应性)应当进行评估。这些实验应当单独评价可能的干扰物质的交叉反应性,同时每个干扰物质也应当与待测物相结合进行评价,以尽可能模拟待测物的生物环境。对于小分子的免疫测定,只要有可能,就应当建立测定的专属性,可以通过使用不同的且已经验证的专属生物分析法(如LC-MS),以特定的分析次数进行比较研究。这些比较分析的样品应当从早期研究中选择,应当在药物服用后的两个或更多时间点进行采集(如在达到最大血浆浓度时和随后对应于几个清除半衰期的时间点),以实现在代谢物浓度增大的环境中对免疫测定性能进行评价。如果免疫测定法符合预先确定的关于参比方法准确度和精密度的标准,那么可以认为免疫测定法与参比方法等同。

蛋白质药物及其候选物的代谢作用/异化作用通常比传统小分子疗法的作用机理更加难以清楚地阐明。蛋白质候选药物代谢作用信息的缺乏阻碍了开发高专属性 and 准确度酶联免疫测定法的进程。此外,足够灵敏、能够执行比较分析的比较方法也很少。因此,确定专属性的方法,亦即预测给定方法的可靠性,包括抗原决定簇定位试验或者免疫测定前采用色谱分离,尽管后面一种方法比较麻烦,并可能显著降低测定的灵敏度。因此,一种诊治蛋白质测定专属性的全面研究比低相对分子质量生物异源物质更加困难。在抗原决定簇,相对微小的变化,比如氨基酸序列变化或者氨基酸发生氧化/去氨基作用,都可能降低待测物的免疫活性。另外,蛋白质水解形成的母体蛋白质主要片段可能导致抗原决定簇的保留,因此蛋白质代谢物的免疫活性也得到保留。这种结构变化可能会,也可能不会改变生物活性,这样服用蛋白质以后,免疫活性也可能会或不会与采集的研究样品的生物活性相关联。如果测定的灵敏度允许,将免疫测定法与色谱法或电泳法相耦合,可能使研究样品中化合物的结构较为清晰,使这些研究样品的免疫测定法产生正响应。对于许多重组蛋白质,诊治剂的抗原决定簇通常不能从那些内源性的同等蛋白质中加以辨别,因此这种重组蛋白质的测定容易产生来自于内源性类似蛋白质的干扰。这种情况给验证分析人员在首选相似基质的



选择方面带来了挑战,这些基质是用于校正标准物质、验证混合样和质控样品的制备。当外源性产物的服用剂量非常低以至于循环浓度在内源性浓度的背景上不会显著增大时,这个问题需要重点强调。很明显,当服用后外源性产物的体内浓度非常高时,低基础水平的内源性待测物在总测定浓度中的贡献可能非常小,足以被忽略不计。这个问题的替代解决方法是将内源性待测物从基质中移除,正如前面讨论到的(见“生物标记的免疫测定法”节),或者使用一种缺乏专属内源性干扰物质的不同生物基质来制备校正标准物质和质控样品。在所有这些方法中,由于内源性待测物的存在,最终制备的校正曲线反映出可以忽略不计的偏差,这一点很重要。

内源性待测物和生物标记免疫测定的验证工作的挑战性

免疫测定法通常用于内源性等同物的诊治分子和生物标记物的定量。开发这些化合物的免疫测定法所面临的挑战与大分子相似。由于生物标记通常总是存在于基质中,因此难以获得无待测物的基质。标准曲线和验证混合样定量的下限(LLOQ)可以通过这些方法制备,包括从基线浓度较低的个体中选择和混合基质,用蛋白质缓冲液稀释基线样品,或者使用待测物浓度可以忽略不计的替代基质。定量的上限(ULOQ)可以通过增加含有待测物的基线样品建立。只要有可能,就应当使用合适的生物基质来制备质控样品。这可以是一种系统基质,比如全血或血浆,也可以是靶专属基质,如唾液、脑脊液、房水、血小板、T细胞或者组织。另外,如果基质效应不显著,质控混合样可以用“无待测物”的蛋白质缓冲液制备。

当进行大分子的验证时,获得性质良好的参比物质比较困难。只要有可能,参比物质也应当具有专属性。在性质良好的标准物质无法获得的情况下,为使用来自于不同来源或不同批号的参比标准物质应当进行交叉研究,并对获得的数据加以归一化处理。

抗体免疫测定的验证工作的思考

抗药抗体实际上属于多克隆抗体,很少能通过样本专属性(特别是人)抗药抗体来制备校正曲线。尽管建立一种定量抗药抗体测定法是一个难题,但是免疫测定法的大部分验证参数仍然可用。尽管无法测定真实的准确度,但是能够在整个测定过程中使用质控样品来监测相对回收率。测定专属性评估应当包括对抗体与微孔板的任何非专属性结合,加样的蛋白质、内源性蛋白质类似物、同时存在的加样药物和抗原-抗体复合物的可能干扰以及评估时样品中可能存在的交叉反应进行评估。

抗药抗体测定的主要问题是阳性抗体响应的定义和解释。在验证过程中,阴性排除值用于辨别抗体的阴性结果和阳性结果,应当通过测定的分析噪声(不精确)和来自

于个体基线样品的背景吸收读数进行评价,这些基线样品由健康志愿者和来自于适当疾病人群的患者提供。基线样品的推荐数量为每个志愿者和患者组至少25个(最好为100个)。如果背景响应趋向于成簇,且测定是精确的,那么在给定的稀释因子下,阴性排除可以定为平均吸收度 $\pm 3SD$ 。然而,如果背景吸收之间存在很大差异,那么决定阴性排除则更加困难。排除应当建立在假阴性结果和假阳性结果的可接受水平基础之上。测定验证设计应当包括将真实响应从假阳性结果中区分的过程。当健康个体中可能存在与各种蛋白质相对的自身抗体时,这一点特别重要。有几种方法可以用来阐明抗体响应是否为真实阳性响应,比如一种用于检测抗体的替代方法(如western blotting)。在某些情况下,当抗体响应依靠几种不同的抗原进行评价时,通过交叉反应性模式可以从假阳性结果中区分出真阳性响应。最后,用药前的响应检查,以及随着与试剂的不断接触,这种响应随时间的变化通常可以辨别真和假阳性结果。此外,体外中和失活活性测定和临床效应体内中和失活的结果可能会为临床上重要的药物专属性抗体的存在提供进一步的支持。

酶联免疫测定法相关的现代技术进展

免疫测定法自身非常灵敏,且具有专属性。然而,随着开发更加灵敏的测定方法以支持临床前和临床研究需求的不断增加,人们正在努力提高这些技术的功能。重要结合试剂、检测系统、新型测定模式和自动化的发展推动了免疫测定技术的进步。

1. 重要结合试剂

尽管大多数免疫测定法使用多克隆抗体作为重要结合试剂,但是1975年Kohler和Milstein开发的单克隆抗体^[22]已经得到了广泛使用,特别是在大分子测定中。它们独特的抗原决定簇专属性表现出在蛋白质双抗体免疫测定中的优势,其中一个单克隆抗体可以通过一个特定的亚单元或抗原决定簇用于捕获蛋白质,而另一个抗体则指向蛋白质的一个不同区域或亚单元,用于检测。使用依着于分子特定区域的抗体,能够增强测定的专属性,这样就可以从母体分子异化产物中分辨出母体分子,从一种异构体中分辨出另一种异构体,或者从蛋白质家族成员中分辨出单个蛋白质。尽管单克隆抗体具有极高的专属性,但是它们与抗原的亲合力通常低于多克隆抗体。因此,采用单克隆抗体作为重要结合试剂建立的竞争性免疫测定法,其灵敏度通常低于那些采用多克隆抗体建立的方法。由于这个原因,单克隆抗体在低相对分子质量待测物竞争性免疫测定中的应用受到了限制。

最近越来越引起人们注意的非抗体结合试剂是核酸适体(aptamer)。核酸适体是以一定方式结合配体或抗原的寡核苷酸序列,这种方式许多方面与抗体-配体相互作用的方式相似^[23]。因此,核酸适体已经表现出与分子结合的高

M

亲和力和选择性,这与蛋白质和低相对分子质量配体不同。核酸适体数据库也已经建立,根据这个数据库,可以鉴别出具有期望结合性质的核酸适体,以及在结合测定中使用的富集浓度。这些分子作为抗体的补充或者替代物使用已经在别处做过评论^[24]。这些试剂提供了抗体可达到的类似灵敏度和专属性,不需要费时的体内工作来产生这些试剂。

噬菌体展示技术为免疫测定中使用的具有明确亲和力和专属性的重组抗体提供了一个来源,无需施于动物体的免疫作用。这种方法涉及丝状噬菌体表皮蛋白质的遗传处理,这种噬菌体生活在大肠杆菌中。这种方法之一是,抗体可变区域(Fv)的编码序列首先从免疫小鼠的脾细胞中分离出来,单链Fv片段的编码序列然后与噬菌体表皮蛋白质融合。在一系列分子生物学步骤的帮助下,包含成千上万个单链抗体的数据库可以显示在噬菌体颗粒的表面,被释放到介质中。通过一系列结合和洗脱步骤(“淘洗”),具有期望亲和力和选择性的抗体混合物最终得以富集。为了获得对新型药物具有合适亲和力和选择性的单链抗体,我们可以反复快速筛选重组抗体噬菌体库,避免传统的费时的抗体产生过程。抗体噬菌体显示技术的详细讨论可以参考 Hoogenboom 等^[25]或 Peterson^[26]的综述文章。

对于小分子的测定,分子印迹高分子(MIP)也有可能作为潜在的人造替代结合试剂^[27]。当作为模板的配体(抗原)存在时,这些结合试剂通过功能性单体(如甲基丙烯酸、4-乙烯基吡啶)的聚合作用进行合成,取决于聚合过程的实验条件。模板配体可能与单体发生相互作用,这可以通过非共价作用、可逆共价作用或者金属离子中介作用发生,其中非共价方式是最常用的。聚合反应完成以后,配体可能被清洗,留下其印迹在聚合物中。对于原始印迹的配体,这种分子印迹的结合性质具有显著的专属性。这些分子印迹高分子已经被用来代替生物衍生抗体,在一定范围的低相对分子质量待测物从生物基质中提取后进行结合测定。这种测定最初在有机溶剂中进行。对于茶碱,在这些条件下,MIP结合测定法与已建立的放射免疫测定法之间具有良好的相关性^[28]。随后,水相测定条件的开发使基于MIP的测定能够用于血浆中普萘洛尔的直接分析^[29]。这些高亲和力的结合试剂具有极强的化学和热稳定性,在室温下具有极长的储存期,这些优势强于抗体。此外,尽管大多数基于MIP的测定已经采用放射标记待测物作为检测系统,但是最近的一些研究已经成功地使用一种荧光检测系统。然而,采用这项技术目前仍受到一定的限制。与抗体相比,MIP的结合亲和力通常较低,这使得其测定灵敏度低于免疫测定法。MIP的使用也受待测物在有机基质中稳定性的限制,在全水相介质中建立这种方法需要进一步的研究,这样在生物流体的直接分析中,其与传统的免疫测定法存在一定的竞争性。

2. 检测系统

监测极低浓度的高效诊治试剂、内源性生物标记分子或者环境毒素时需要更高的灵敏度,这种需要已经成为新

型检测系统发展的主要动力以替代酶联免疫测定法中常用的显色底物。

文献报道中有大量例子,即使用荧光代替紫外光吸收来作为免疫测定的终点检测系统。需要特别指出的是,使用随时间衰减型荧光检测^[30],借助这种短暂荧光在测定标记抗体复合物的荧光之前发生衰减的方法,可以大大避免复杂基质中的背景荧光问题以获得高灵敏度。这些程序经常使用螯合剂作为长效荧光团。最近一个关于这种方法的例子是使用分时荧光免疫测定法分析血浆中的肠内脂——一种通过肠内细菌由富纤维食物产生的木酚素,因此被称为健康饮食的一种生物标记^[31]。这种测定法使用一种与螯合剂耦合的肠内脂衍生物作为荧光团,可以达到1.5nmol/L的灵敏度。药学领域的例子包括人血清中依那普利拉的测定^[32]和人血浆中山帕曲拉的测定^[33],其定量限为200~500pg/mL。在荧光偏振技术中,检测建立在荧光团分子与抗体结合时发出的偏振光变化的基础之上。这种偏振变化与未标记抗原的浓度相关,因此可以通过标准曲线内标法得到未知样品中待测物的浓度。这种方法具有均相性、易于自动化等优点,已经广泛实现商业化,如诊治药物监测等应用,但是最近已经出现其在药物探索中高通量筛选的新应用^[34]。

化学发光^[35]提供了另一种灵敏的检测系统,其仪器装置简单,易于操作,但是会受到复杂基质中一定程度的背景干扰。最近的一个采用化学发光作为检测系统的酶联免疫测定例子是DNA中8-羟基鸟嘌呤的测定^[36],使用一种与过氧化酶-抗过氧化酶复合物配对的二级抗体和一种含有过氧化氢、发光氨和对碘酚的底物溶液。

随着电化学发光的发展,化学发光作为检测系统的用途已经得到很大扩展。尽管人们从20世纪60年代就开始研究电化学发光,但是直到现在,只有由IGEN公司开发的这种系统实现商品化。在他们的系统中^[37],一种前体分子三丙胺(TPA)扩散到电极表面被激活,导致报告分子钌三联吡啶被激发。当报告分子从激发态回到基态时,在特定波长处发出光子,通过灵敏的光电倍增管得到检测。这种系统包括一个电化学流动池和在电极上捕获标记分子的磁力珠技术(magnetic bead technology),从而可进行电化学循环。因此,在大分子的常用免疫测定中,可能会使用两种不同的抗待测物抗体(识别不同的抗原决定簇)。一种抗体可以用生物素标记,与链霉抗生物素蛋白复合磁力珠形成复合物,而第二种抗体用钌复合物标记。在孵化过程中,待测物被两种抗体夹在中间,接着这种混合物进入流动池,抗原抗体复合物在电极表面被磁力捕获。经清洗,被捕获抗原抗体复合物中钌复合物的量通过激活电极,对发出的光定量而得到确定。这种方法已经用于许多待测物的生物分析,举个例子,人血清中干扰素 α -2b的生物素抗生物素蛋白耦合测定,灵敏度达到4IU/mL^[38]。

随着表面等离子共振(SPR)在免疫化学中的应用,检测系统已经延伸到生物传感器和免疫传感器领域。SPR是大量光免疫传感器技术之一^[39],当发生抗原抗体结合

时,入射光的共振角发生变化。在测定仪器(如 Biacore)中,典型的实验设计可能涉及抗体在微型小池金或银表面的吸附,小池的后面为棱镜或衍射光栅。当含有抗原的溶液流经微池时,抗原抗体复合物的形成使反射光的角(共振角)在金属表面发生改变。已有报道指出,共振角的这种漂移与进入系统的抗原浓度呈线性关系。由于这种方法不需要标记试剂,所以 SPR 非常简单;然而,这项技术不能区分抗原识别和非专属性结合,同时灵敏度低也会成为一种限制因素。然而,近来的发展包括脂质体与三明治免疫测定模式的联合,使干扰素测定的灵敏度能够达到皮摩级^[40]。另外一种应用为牛奶中的低相对分子质量生物异源物质磺胺甲噁唑的测定,待测物与传感芯片的金表面发生共价耦合^[41]。最终响应是校正溶液和研究样品中共价结合的磺胺甲噁唑和自由抗原竞争多克隆抗体中结合位点的结果,多克隆抗体也处于溶液中。这种测定的灵敏度在 1.7~8.0 μg/kg 的范围内。

3. 测定结构和自动化

当免疫测定中使用的抗体并不具有固有专属性时,测定前可以应用一些分离步骤,如高效液相色谱。这些耦合方法中前景更大的是毛细管电泳免疫测定法(CEIA)^[42]。这种方法具有大量优点,包括样品量小、试剂消耗少、简单、易于实现自动化、能够同时测定多个待测物,以及检测技术的范围宽。当与激光感应荧光耦合作为检测方法和酶扩大时,CEIA 可与标准的免疫测定技术相提并论,测定灵敏度在 10 pmol/L 范围内。应用这些检测方法,CEIA 的分辨能力能够将结合抗体从自由抗原中分离出来。因此,这项技术可以设计为在线应用。尽管在高通量方面具有明显的潜力,但是目前 CEIA 只能应用一种连续模式,每次分析一个样品。CEIA 已经广泛用于抗体描述以及大量低相对分子质量待测物的免疫测定,包括地高辛、吗啡和可的松。

免疫测定法在医学诊断领域已经取得了令人瞩目的成功,这主要是因为其易于实现自动化、高样品通量和每次测定成本较低等优点。免疫测定自动化的难题和挑战最近已经由 Bock 提出^[43]。酶联免疫测定法在自动模式中的最近一次应用是在药物探索中支持高通量筛选^[44]。在这一实例中,测定试剂与一种凝胶基质结合,这种方式优于多孔板模式,在自动化的帮助下,一名技术人员一天就可以进行 1000~10 000 次测定。微型阵列模式的多待测物免疫测定法也已有报道^[45]。

自动化也推动了在线和流动注射免疫测定法的发展。这些方法涉及流动系统中测定试剂的连续注射和抗原-抗体反应。采用荧光检测并流动注射再生的表面免疫测定法(FIRSI)能够达到一定的目的^[46]。在这种流动系统中,包有抗体的珠体保留在检测器附近的平面上;然后,已标记和未标记的待测物被注入,流经珠体,此时反应开始。接着珠体被清洗,检测器获得最终的抗体结合读数,再反向流动,移除珠体,准备下一次进样。类似的系统,有时使

用磁性颗粒耦合免疫球蛋白,使抗体结合物与自由配体的分离更加容易^[47],这已经作为检测方法与电化学发光^[48]或激光感应荧光^[49]联用。

结论

酶联免疫测定法的竞争模式和非竞争模式已经广泛用于大范围低相对分子质量化合物和大分子的生物分析。通过使用荧光底物和放大系统,如抗生物素蛋白-生物素,酶联免疫测定法的灵敏度已经等于或者超过放射免疫测定法^[50]。这种技术在新型重组蛋白质测定、验证大分子的抗体响应、测定疾病的生物标记以及医学诊断等方面尤其有着广泛应用。

对于所有用于药物开发的生物分析方法,免疫测定法的验证非常重要。然而,几个免疫测定法的验证问题特别需要注意。这其中包括重要试剂的稳定性、校正曲线的曲线性、免疫测定法的较大变异性,尤为重要是测定的专属性。

最后,许多新型的结合试剂、检测方法、测定结构和自动化应用正在得到研究,以进一步推动免疫测定法的发展。这其中包括仅需少量或无需动物免疫以生产结合试剂,如噬菌体显示抗体库、寡核苷酸配体库和合成分子印迹。电化学发光和表面等离子共振等检测方法使灵敏度已经等于或者优于放射免疫测定法,且不受放射活性的限制。免疫测定法的自动化和微型化也已经得到发展,同时还有在线技术,如 CEIA 和流动注射法。这些成就将继续确保免疫测定法灵敏度和专属性的提高,并通过商品化得到广泛应用。

参考文献

1. Yalow, R. S.; Berson, S. A. Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man. *J. Clin. Invest.* 1960, 39, 1157-1175.
2. Colburn, W. A. Selecting and Validating Biologic Markers for Drug Development. *J. Clin. Pharmacol.* 1997, 37 (5), 355-362.
3. Tai, H. H. *Enzyme Immunoassay*, 1st Ed.; Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1992; 5, 201-233.
4. Mattiasson, B.; Hakanson, H. Immunochemically Based Assays for Process Control. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 1992, 46, 81-102.
5. Rubenstein, K. E.; Schneider, R. S.; Ullman, E. F. "Homogeneous" Enzyme Immunoassay: New Immunochemical Technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972, 47 (4), 846-851.
6. Hage, D. S. Affinity Chromatography. *Clin. Chem.* 1999, 45 (5), 593-615.

7. Got, P. A.; Scherrmann, J. M. Stereoselectivity of Antibodies for the Bioanalysis of Chiral Drugs. *Pharm. Res.* 1997, 14 (11), 1516—1523.
8. Fujiwara, K.; Matsumoto, N.; Masuyama, Y.; Kitagawa, T.; Inoue, Y.; Inouye, K.; Hougaard, D. M. New Hapten-Protein Conjugation Method Using N-(M-amino-benzoyloxy) Succinimide as a Two-Level Heterobifunctional Agent; Thyrotropin-Releasing Hormone as a Model Peptide without Free Amino or Carboxyl Groups. *J. Immunol. Methods* 1994, 175 (1), 123—129.
9. Schwarz, S.; Schumacher, M.; Ring, S.; Nanninga, A.; Weber, G.; Thieme, I.; Undeutsch, B.; Elger, W. 17 β -Hydroxy-11 α -(3'-Sulfanylpropyl) oxy-estra-1, 3, 5 (10)-trien-3-yl sulfamate—A Novel Hapten Structure; Toward the Development of a Specific Enzyme Immunoassay (EIA) for Estra-1, 3, 5 (10)-trien-3-yl sulfamates. *Steroids* 1999, 64 (7), 460—471.
10. Working, P. K.; Cossum, W. A. Clinical and Preclinical Studies with Recombinant Human Proteins; Effect of Antibody Production. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Peptides, Peptoids and Proteins*; Garzone, P. D., Colburn, W. A., Mokotoff, M., Eds.; Ch. 13; Harvey Whitney Books; New York, 1991; 201—233.
11. Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Review. Meeting of the Biological, Response Modifiers Advisory Committee, Bethesda, Maryland, July, 15, 1999.
12. Shah, V. P.; Midha, K. K.; Dighe, S.; McGilveray, I. J.; Skelly, J. P.; Yacobi, A.; Layloff, T.; Viswanathan, C. T.; Cook, C. E.; McDowell, R. D.; Pittman, K. A.; Spector, S. Analytical Methods Validation; Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. *Pharm. Res.* 1992, 9, 588—592.
13. Food and Drug Administration, Draft Guidance for Industry on Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. Docket No 98D-1168, Federal Register 64, 1999; 517.
14. Findlay, J. W. A.; Smith, W. C.; Lee, J. W.; Nordblom, G. D.; Das, I.; DaSilva, B. S.; Khan, M. N.; Bowsher, R. R. Validation of Immunoassays for Bioanalysis; A Pharmaceutical Industry Perspective. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000, 21, 1249—1273.
15. Findlay, J. W. A.; Das, I. Some Validation Considerations for Immunoassay. *J. Clin. Ligand Assay* 1997, 20 (1), 49—55.
16. Findlay, J. W. A. Validation in Practice—Experience with Immunoassay. *Bio-International 2. Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies*; Blume, H. H., Midha, K. K., Eds.; Medpharm Scientific Publishers; Stuttgart, 1995; 361—370.
17. Findlay, J. W. A.; Das, I. Validation of Immunoassays for Macromolecules from Biotechnology. *J. Clin. Ligand Assay* 1998, 21 (2), 249—253.
18. Shah, V. P.; Midha, K. K.; Findlay, J. W. A.; Hill, H. M.; Hulse, J. D.; McGilveray, I. J.; McKay, G.; Miller, K. J.; Patnaik, R. N.; Powell, M. L.; Tonelli, A.; Viswanathan, C. T.; Yacobi, A. Bioanalytical Method Validation: A Revisit with a Decade of Progress. *Pharm. Res.* 2000.
19. AAPS Workshop. Bioanalytical Methods Validation for Macromolecules, Arlington, VA, 1-3 March 2000, American Association of Pharmaceutical Scientists; Alexandria, VA.
20. Smith, W. C.; Sittampalam, G. S. Conceptual and Statistical Issues in the Validation of Analytic Dilution Assays for Pharmaceutical Application. *J. Biopharm. Stat.* 1998, 8 (4), 509—532.
21. Kringle, R. O. An Assessment of the 4-6-20 Rule for Acceptance of Analytical Runs in Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies. *Pharm. Res.* 1994, 11 (4), 556—560.
22. Kohler, G.; Milstein, C. Continuous Culture of Fused Cells Secreting Specific Antibody of Predefined Specificity. *Nature* 1975, 256 (5517), 495—497.
23. Ellington, A. D.; Szostak, J. W. In Vitro Selection of RNA Molecules that Bind Specific Ligands. *Nature* 1990, 346 (6287), 818—822.
24. Jaysena, S. D. Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clin. Chem.* 1999, 45 (9), 1628—1650.
25. Hoogenboom, H. R.; de-Bruine, A. P.; Hufton, S. E.; Hoet, R. M.; Arends, J. W.; Roovers, R. C. Antibody Phage Display Technology and its Applications. *Immunotechnology* 1998, 4 (1), 1—20.
26. Peterson, N. C. Recombinant Antibodies; Alternative Strategies for Developing and Manipulating Murine-Derived Monoclonal Antibodies. *Lab. Anim. Sci.* 1996, 46 (1), 8—14.
27. Andersson, L. I. Molecular Imprinting for Drug Bioanalysis; A Review on the Application of Imprinted Polymers to Solid-Phase Extraction and Binding Assay. *J. Chromatogr. B* 2000, 739 (1), 163—173.
28. Vlatakis, G.; Andersson, L. I.; Muller, R.; Mosbach, K. Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting. *Nature* 1993, 361 (6413), 645—647.
29. Bengtsson, H.; Roos, U.; Andersson, L. I. Molecular Imprint-Based Radioassay for Direct Determination of S-Propriololol in Human Plasma. *Anal. Commun.* 1997,



- 34 (9), 233—235.
30. Dickson, E. F.; Pollack, A.; Diamandis, E. P. Ultra-sensitive Bioanalytical Assays Using Time-Resolved Fluorescence Detection. *Pharma. Ther.* 1995, 66 (2), 207—235.
31. Adlercreutz, H.; Wang, G. J.; Lapcik, O.; Hampl, R.; Wahala, K.; Makela, T.; Lusa, K.; Talme, M.; Miko-la, H. Time-Resolved Fluoroimmunoassay for Plasma Enterolactone. *Anal. Biochem.* 1998, 265 (2), 208—215.
32. Yuan, A. S.; Gilbert, J. D. Time-Resolved Fluoroimmunoassay for the Determination of Lisinopril and Enalaprilat in Human Serum. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1996, 14 (7), 773—781.
33. Venn, R. F.; Bernard, G.; Kaye, B.; Macrae, P. V.; Saunders, K. C. Clinical Analysis of Smaptrilat, a Combined Renal Endopeptidase and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor II: Assay in Plasma and Urine of Human Volunteers by Dissociation Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay (DELFLIA). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 16 (5), 883—792.
34. Nasir, M. S.; Jolley, M. E. Fluorescence Polarization: An Analytical Tool for Immunoassay and Drug Discovery. *Comb. Chem. High Throughput Screen* 1999, 2 (4), 177—190.
35. Baeynes, W. R.; Schulman, S. G.; Calokerinos, A. C.; Zhao, Y.; Garcia-Campana, A. M.; Nakashima, K.; De Keukeleire, D. Chemiluminescence-Based Detection: Principles and Analytical Applications in Flowing Streams and in Immunoassays. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 17 (6/7), 941—953.
36. Bruskov, V. I.; Masalimov, Z. K.; Usacheva, A. M. Chemiluminescence Enzyme Immunoassay of 8-Oxoguanine in DNA. *Biochemistry (Moscow)* 1999, 64 (7), 803—808.
37. Yang, H.; Leland, J. K.; Yost, D.; Massey, R. J. Electrochemiluminescence: A New Diagnostic and Research Tool. *Biotechnology* 1994, 12 (2), 193—194.
38. Obenauer-Kutner, L. J.; Jacobs, S. J.; Kolz, K.; Tobias, L. M.; Bordens, R. W. A. A Highly Sensitive Electrochemiluminescence Immunoassay for Interferon Alfa-2b in Human Serum. *J. Immunol. Meth.* 1997, 206 (1—2), 25—33.
39. Rabbany, S. Y.; Donner, B. L.; Ligler, F. S. Optical Immunosensors. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 1994, 22 (5—6), 307—346.
40. Wink, T.; van Zuilen, S. J.; Bult, A.; van Bennekom, W. P. Liposome-mediated Enhancement of the Sensitivity in Immunoassays of Proteins and Peptides in Surface Plasmon Resonance Spectrometry. *Anal. Chem.* 1998, 70 (5), 827—832.
41. Gaudin, V.; Pavy, M-L. Determination of Sulfamethazine in Milk by Biosensor Immunoassay. *J. AOAC Int.* 1999, 82 (6), 1316—1320.
42. Bao, J. J. Capillary Electrophoretic Immunoassays. *J. Chromatogr. B* 1997, 699 (1/2), 463—480.
43. Bock, J. L. The Era of Automated Immunoassay. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000, 113 (5), 628—646.
44. Karet, G. More Compound Tested with Less Automation. *Drug Dis. Dev.* June-July 2000, 48—51.
45. Silzel, J. W.; Cercek, B.; Dodson, C.; Tsay, T.; Obremski, R. J. Mass-Sensing, Multianalyte Microarray Immunoassay with Imaging Detection. *Clin. Chem.* 1998, 44 (9), 2036—2043.
46. Pollema, C. H.; Ruzicka, J. Flow Injection Renewable Surface Immunoassay: A New Approach to Immunoanalysis with Fluorescence Detection. *Anal. Chem.* 1994, 66 (11), 1825—1831.
47. Sole, S.; Alegret, S.; Cespedes, F.; Fabregas, E.; Diez-Caballero, T. Flow Injection Immunoanalysis Based on a Magnetoimmunosensor System. *Anal. Chem.* 1998, 70 (8), 1462—1467.
48. Arai, K.; Takahashi, K.; Kusu, F. An Electrochemiluminescence Flow-Through Cell and its Applications to Sensitive Immunoassays Using *N*-(aminobutyl)-*N*-ethylisoluminol. *Anal. Chem.* 1999, 71 (11), 2237—2240.
49. Tao, L.; Kennedy, R. T. On-line Competitive Immunoassay for Insulin Based on Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection. *Anal. Chem.* 1996, 68 (22), 3899—3906.
50. Hashida, S.; Hashinaka, K.; Ishikawa, E. Ultrasensitive Enzyme Immunoassay. *Biotechnol. Ann. Rev.* 1995, 1, 403—451.

(洪贇飞 陈桂良 蔡宏奎 译)

M

美国国内的医疗保健体制

Henri R. Manasse, Jr.

American Society of Health-system Pharmacists, Bethesda, Maryland, U. S. A.

引言

一个国家的医疗保健体制反映了该国的社会、政治、经济和文化等特征。国家的起源、占主导的价值观规定了该国的医疗保健的政策方针、组织方向及其资金的投入、服务的质量和获取等。这些因素决定什么样的人可以享受什么样的服务,即在什么地方、以什么价格和由谁支付等。

美国文化和社会发展独特的历史经历造就了现行的这样一种医疗保健体制。正是在这样的背景下,才有了这样一种在特征和组织上极具美国特色的医疗保健体制。虽然现在美国医疗体制所面临的一些问题与其他发达的工业化国家有某些相似,但许多因素对于美国来说却是特有的。

社会价值观,即社会对人类本质的共同信念和社会结构在制定政策方面起着重要的作用。政治和经济上的决策在很大程度上取决于盛行的社会价值观。因此如果占主导的社会价值观认为每个社会成员都应享有医疗保健的权力,那么就应顺应这种观念制定政治和经济政策。核实这些背景原因的一种办法是关注一下社会的各种价值取向。

Donabedian^[1]提出价值取向可以从两种相对立的立场来考虑:自由意志主义立场和平等主义立场。Dougherty^[2]还增加了功利主义和契约主义等价值取向。这些将社会价值观分门别类的实质是给广大个体群所持有的各种具体信念和价值观以典型化的描述。

自由意志主义的哲学思想流派着重强调个人成就和不受政治干预的自由。该流派注重个人应该有自由理性地对什么对自身有益做出自己的评价和确认,然后根据自己的财力、体力和人力资源自我决定进一步的行为。对于这个观点, Doughterty^[2]补充说:

因为人类有思维能力,他们能够理解他们所处的情形和他们所拥有的选择。因为他们可以选择,人们就可以或认可或改变他们所处的情形。又由于人类会思考又有选择,他们应有自由制定自己的生活蓝图,创立自己赖以生存的价值。

那么顺理成章的是:占主导地位的自由意志主义价值观就会牢固占据这些靠自我奋斗、白手起家的人们的头脑,而社会的回报只应该属于那些创造财富和有资格获得回报的人。因此,政府所扮演的角色仅限于坚决保障个人有权力按自己认为最好的方式表达个人的意愿。此外,政府的作用还限于那些个人所无法提供的公共职责和需求,如国防、谈判条例等。

平等主义原则强调所有个体在道义上都享有平等的地位,不论其成就多寡、地位高低。这种哲学观还强调机会

均等。在可能的情况下不考虑个人的需求和需要。这样,平等主义^[2]能被理解为以下几点:

事实上这意味着每个人都有平等的权力来分享那些为正常人的生活所必需的基本商品和服务,其中包括防止和减少心理和生理痛苦、残障及过早死亡的社会医疗保健服务等。

平均主义价值观对政府制定政策提出了具体的要求,要求他们建立广泛的服务和援助体系,使社会的每个成员都有平等的机会享受社会提供的旨在防止和减少身心痛苦和残障、实现人生目标的各项服务措施。这样,政府就可以按社会每个成员应得的权益行事。这种权益可以通过法律程序,也可以通过其他公众协商方式来决定。

自由意志主义和平均主义不同的价值观,对平等、正义、机会、权力以及政府功能性的职责持不同的观念。当这些不同的社会价值观反映在医疗、保健及医疗保健服务的管理和资金投入等问题上时,就会产生诸多不同排序的设计方案,这一点不足为奇。因为医疗保健与个人的、文化的及社会的理念密切地融合在一起,全世界有那么多种医疗保健体制和对健康的不同理念也就不足为奇了。

由于历史的渊源,美国强烈地倾向于自由主义的哲学观点^[3]。源自欧洲的“基督教徒道德观”的影响,加之新大陆提供的“成为自己的主人”的种种机会,这些都会在美国社会中强劲地表现出来。毫无约束的自由市场经济和公民日常生活不受政府干预的自由,这些价值观已经深深地融入了美国人的生活方式,与美国的政治经济观念也已融为一体。“依靠自己的力量”这一理念清楚地反映在这些占主导地位的社会、政治和经济价值观上。这些先决条件可以用来描述美国医疗保健体制的特征。因此美国所采用的办法必然是多元的,其多样性令人着迷。这是一个很市场化、很工业化的制度,同时也可以说是世界上最好的也是麻烦最多的体制之一。

美国并不具有许多发达国家所拥有的统一的医疗保险计划,也没有像英国和其他一些国家所具备的国家医疗保健服务。除了那些在美国拥有特殊法律权利的人以外,美国医疗保健体制,在很大程度上是私有制,换句话说,是一个产业化体制。在医疗保健服务的提供者、支付者及其实施等方面体现出一种多样性:有私人代理,有公司,有保险机构,还有国家代理等。在制定医疗保健政策和方向等方面全国没有一个统一的理性化的协调依据。更确切地说,为了推行任何有人愿意出钱的建议,想法多,主意也多。Relman曾把这种方法称为“医疗保健的产业化”^[4]。

联邦政府和州政府在医疗保健体制中的作用仅限于那些法律上被归属于联邦和州法律所管辖的津贴计划,或联

邦政府和州政府合伙参与的津贴计划。联邦政府参与提供医疗保健服务始于美国政府的一个代理机构——美国公共卫生服务部 (PHS), PHS 创始于 1798 年, 为海上商务人员和美国军人提供基本的医疗服务。后来又增加了为享有特殊权益的人员提供医保服务并支付费用。这些人员包括退役老兵、贫困老人、土著美国人、艾滋病患者、某些残障人员和被确诊为晚期肾衰竭患者等。例如, 获准享有医疗保健服务的老兵可以享用“老兵事务部”——联邦政府属下的一个部级行政机构下辖的医院、诊所和长期医疗机构所提供的服务。自 1965 年以来, 联邦政府一直在资助 Medicare 这一先为 65 岁以上的老人后又为残障人员提供医疗保障的保险项目。联邦政府还和共同参与的州政府为提供 Medicaid 项目 (1965 年开始实施) 项下的服务共同分担费用。Medicaid 是为核准的贫困人员提供医保的保险项目。在 Medicare 和 Medicaid 这两个保险项目中, 个人和机构资助者按照一系列具体的参与条款以缔约者身份参与事项。

州政府与地方 (市或县) 政府在提供医保服务方面有各自的权限。美国各州、县和市的医保部门的组织和功能各不相同。这些机构所反映和代表的是不同地区和各自不同领域人口构成的特殊需求。因此, 纽约市卫生部门所提供的服务范围和其的作用与蒙大拿乡村的类似机构所提供的服务会大不相同。

这一医保体制运用的独特方式还必须根据美国地理和人口组成多样化加以检验, 美国大约有 27 300 万人口, 分别居住在 900 多万平方公里的国土上。美国疆土辽阔, 地形各异, 有内华达州的沙漠, 有科罗拉多和怀俄明州的落基山脉, 有佛罗里达州的热带地区, 还有东西南岸的沿海地区^[5]。因此, 在这片地理地貌多样化的国土上实施医疗保健服务存在着诸多挑战。

美国的人口同样多种多样。65 岁以上的人口有大约 3500 万。非裔美国人占总人口的 12.8%, 亚裔和来自太平洋诸岛的人口占 4%, 美国印第安人占 0.9%, 白种人占 82%^[5]。因为美国在很大程度上说是一个移民国家, 为此有数以百计的另外民族团体成为美国社会的组成部分。根据 1997 年 3 月的统计, 全美国有 2580 万人出生在国外, 比 1990 年增长了 30%, 当时在国外出生的人口为 1980 万。出生地在墨西哥的人有 700 万, 占 1997 年统计时所有国外出生人口的 28%^[5]。1996~1997 年, 有 130 万人从国外移居美国, 其中 92% 的人进入了大都市。不过, 在此期间有 300 万人离开了中心城市, 280 万人移到郊区^[6]。为此应该在下述背景下来看待美国的医疗保健体制:

- 有多种社会价值观并存, 其中大部分价值观由于历史的渊源更多地倾向自由意志主义而不是平均主义。
- 联邦政府、州政府及地方政府在保健服务的提供和资金投入等方面权力有限。
- 医疗保健服务的提供采用的是多元的、自由市场式的模式。
- 疆域辽阔, 地理变化大。
- 文化多元, 人口众多, 老人增多, 人种民族更趋异

样化。

为了了解美国的医疗保健体制以及医保政策如何在美形成和推行, 读者必须对上述这些背景知识感觉敏锐, 这一点至关重要。

美国医疗保健服务的组织

美国医疗保健服务由多种机构提供, 资金来源各不相同。根据 1998 年的统计, 美国有 6021 家医院^[7], 有 1 012 582 张病床, 有 33 765 940 住院人次和 241 574 380 患者住院天数。1998 年在社区医院住院的平均时间为 6 天, 而 1975 年是 7.7 天^[7]。

还有一点可以注意到的是: 城市和农村的医院数量正在减少。1993 年有 3012 所城市医院和 2249 所农村医院, 而到 1998 年城市医院只有 2816 家, 农村医院只有 2199 家^[13]。公共急性保健医院从 1993 年 1390 所降至 1997 年的 1260 所^[8]。医院关闭和伴随而来的病床减少现象在市中心地区也有所发生, 而那些地区医保原来是为大量的贫穷患者提供的。这样的医院关闭与巨大的保健费用有关。州政府和联邦政府所支付的医保费用常无法与医院的开支相抵, 这不仅因为有些患者不符合享受政府津贴条件, 还因为政府所支不能包括所有的费用。规模小的、地处偏僻的农村医院正面临着同样的经济困难和生存问题。农村医院的困境具有特殊的意义, 因为它们的存亡经常关系到农村社区的经济和社会存亡。

当世界人口以 1.7% 的年增长率增加时, 65 岁以上的人口每年增长 2.5%。全世界 60 岁以上的人口略少于 6 亿人, 其中约有 3.6 亿生活在发展中国家, 在发展中国家老年人占 7.5%。而在发达国家老年人比例为 18.3%。在某些发展中国家情况正在发生快速的变化。据预测, 在未来的 30 年中, 那些国家中的老年人将增加 200%~400%^[9]。因为老年人口的增长, 对老年的和长期的保健机构需求也增加了。在未来的几十年中, 美国的老年医疗保健费用将达每人约 25 000 美元 (以 1995 年的美元值计), 而在 1995 年, 每人的费用为 9200 美元^[10]。在这方面, 美国的发展趋势与大部分发达工业国所表现出来的趋势相同。

越来越多的老年人享受医疗保健服务可能会给已经应接不暇的医疗保健体制增加额外的压力。无论是通过预防措施还是通过分配公正化的其他法令来增加预期寿命, 在解决一些问题时也会产生一些问题。这些矛盾必然会使决策的政治和社会过程复杂化。同样可能的是这些现象会对已经负担过重的国家经济增加负担。

在过去的几年中, 强调的是替代性, 因为越来越多的程序是在门诊完成的。许多以前需在医院内实施的服务, 现在在医生的办公场所就能进行。1996 年到内科医生处就诊的有 73 493 000 次, 平均每人 3.4 次^[11], 就诊的最常见缘由是做一般的体检, 1996 年的总量为 54 700 000 次。同样在 1996 年到门诊部就诊有 67 200 000 人次及完成 40 300 000 住院患者的外科手术^[11]。这个分析认为, 作为给予保健帮助的



M

部门,流动保健站的重要性增强了。门诊患者保健将继续壮大,更多的医疗程序在医院外完成,预防保健要进一步加强。单独在社区医院的门诊就诊从1986年的263 631 000人次发展为1990年的310 329 000人次、1998年的474 193 000人次^[7]。

国家家庭保健协会估计每年超过20 000人,而大约800万的个人提供家庭保健服务^[12]。据医疗保健财政部(HCFA)的消息,每个Medicaid受益人一年家庭健康就诊平均数为80次,而在1989年仅为27次。另外,参加Medicare的家庭保健所的数量从1988年的5000所增加到1997年超过10 000所^[13]。家庭患者保健很可能被推广,因为有数据进一步证明这样的保健减少了支付的费用,也没有使质量受到影响。与在家里提供的精心治疗相关的技术和科学的发展也将刺激健康服务方面的成长。

医疗保险可达范围的趋势

根据总统医保业质量和消费者权益保护顾问委员会所提供的资料表明,有五大趋势可对20世纪90年代后期的医疗保险计划的特点加以描述:

- 保健计划的复杂性和集中性有所增强。
- 健康保险产品的品种增多。
- 加强了网上支付。
- 正在改变买主、保健计划和提供者之间的财政结构和激励机制。
- 利用管理和质量改进的临床基础设施得到了发展^[14]。

为了应对快速增长的医疗保健费用,私人保险公司和雇主(他们为属下的员工支付全部或部分的保费),在实施费用控制策略方面已经增加了一部分额外的费用。他们在选择医保提供者、保健机构以及支付手段方面还引人注目地应用了商业法则。

在购买医保费用方面,私人雇主、联邦政府以及州和地方政府都投入了相当的人力和财力。1995年在私人健康保险方面,私人雇主所投入的保险费为1838亿美元,联邦政府为113亿美元,州和地方政府为471亿美元^[14]。1995年私人投保率超过83%,其中约31%享受公共计划,如Medicare或Medicaid。

可能近几年美国医疗保健体系最显著的改变是管理保健(managed care)的发展。在这种管理保健模式下,相关的公司负责提供服务,而同时易受非预期服务项目的财政风险的影响。运作时由健康维护组织(HMO)与医院及医生联系,在商定的费用目录范围内提供服务。HMO及其他管理保健组织指定提供保健服务的地点和人员。在传统的赔偿及服务费用报销方案下,这一点与患者和医生都享有的历史上著名的“选择自由”大相径庭。传统的医疗服务付费方法是,服务提供者对所提供的每次服务索取一笔费用,由承保人支付全部或部分服务费用。

对于HMO和所有保健项目来说,管理保健是个涉及面很广的专门术语,它包括按每月预先设定的费用提供保健服

务,在规定的医院和基本的保健医生网络中协调保健服务。一个网络通常包括医生、诊所、保健中心、医院、医疗团体和其他一些医保服务提供者,保健项目选择这些人员、机构和场所,并与其接触为项目下的人员提供服务。一个健康维护组织是按每月预先设定的支付计划提供保健服务。大多数HMO是通过一个网络中的医生、医院和其他医疗专业人员提供保健服务,其成员必须使用该网络才能报销其医疗费用。

HMO有多种模式。一种叫雇员制HMO,在这种模式下,医生和其他医务专业人员是拿工资的雇员,他们行医的诊所或保健中心由HMO所有。还有一种叫集体制HMO,这类HMO由一两个医生团体组成,这些团体不归HMO所有,他们以独立的合伙者或职业公司参与运作。HMO根据商定的比率,给这些团体支付酬劳,各团体负责支付自己的医生和其他员工工资,并且还得承担医院和外聘专家所提供的服务费用。一个独立的行医协会(IPA),通常包括大量的个体私人医生,这些医生的收入包括行医所收取的费用和每个患者参加IPA会员保健所付的固定费用。Preferred Provider Organization是一个医生和医院的网络,它提供的保健比传统的保险价格低。PPO会员在使用PPO网络内服务时可享用较多的保健项目,如接受PPO网络外保健服务,则需用更多的现金支付^[15]。

联合制保健体系是协调提供连续服务的网络,对后果负有临床和财政责任。20世纪90年代后期联合制保健体系得到了显著的发展。1997年有228个联合制体系,1998年有266个,增加了几乎17%^[16]。在此同时,也有些联合体系因合并失败和内部分歧而解体。Iglehart就管理保健如何改变了原有的医疗保健的面貌做了如下的评论:

在管理保健出现前,主要是由医生以患者的名义单独行事,决定大部分保健费用如何使用。医生为他们所提供的服务列出账单,由第三方承保人支付费用,通常承保人也不提出什么置疑,因为最终的付款人——雇主并不要求详细的账目。现在许多雇主从原来被动的支付人转变成了积极进取的买主。他们对支付比率、就医场所和保健项目施加了越来越多的影响。管理保健计划通过有选择地与医生签约,严格审查服务的用途及实施方案,并按人头以固定价支付费用,这样迫使医生减少服务项目,改进保健的协调与管理,进而改变了许多医生的看病方式。为力求平衡因有限制的为患者提供保健服务而引起的冲突,医生成了“双重代理”。长期连接诸多医生和私人行政主管们之间的传统观念——一种对资本主义和自由企业的信赖,因企业通过管理保健积极干涉医疗实施而被削弱了^[17]。

目前对管理保健的核心原则又提出了一个新的挑战,决策集中化可能会改善保健实施,减少支付费用。1999年11月一个大医疗保健公司决定允许医生选择患者所需要的保健项目,而不需要保险公司的介入或批准。这一做法打开了进一步讨论如何利用管理保健原理之门。不管管理保健将来的趋势如何,经费控制措施对于防止医疗保健费用暴涨是必不可少的。但经费控制应以保证患者有权享受保健服务为前

提。常被人称为“管理保健之父”的 Paul Ellwood 认为将来会出现一个新的时代,在这个时代中真正有权力的不是雇主,也不是政府买主,而是患者^[18]。不管怎样,政治和消费者的压力再加上经验和经济效益将决定着管理保健的未来。

医疗保健的资金来源

在美国,用于医疗保健的费用已由 1967 年的 510 亿美元(占 GNP 的 6.3%)增加至 1997 年的超过 1 万亿美元(占 GNP 的 14%)^①。1997 年按人头算,医疗保健的支出为 4090 美元^[19],花费在处方药上的是每人每天 0.64 美元^[20],这比起其他工业化的国家都要高出许多。在比较包括经济合作和发展组织(OECD)在内的一些主要工业化国家的保健费用时,便可发现在人均支出上各国有着巨大的差别^[21]。这样的差别也体现在 GDP 花费在医疗保健的比重上^[21]。在这些国家中,用于保健的费用随着时间而变化的相对增长差异也十分的大^[21,22]。

医疗保健财政当局声称,到 2008 年时国家卫生保健的支出总数计划为 2.2 万亿美元,达到 GDP 的 16.2%。健康支出的增长计划比 1998~2008 年 GDP 的增长率平均高出 1.8 个百分点。这个差别比高于目前的增长率,却仍低于历史上 1960~1997 年的平均水平,当时健康支出的增长超过了 GDP 的增长将近 3 个百分点。有一些因素会影响计划中的增长,其中包括:

- 私人健康保险认购期的增长;
- 管理保健加入人数增长减缓;
- 管理保健更趋灵活性,限制减少;
- 州政府和联邦政府对保健计划的监督管理趋强的趋势不会改变。

随着保健费用的增长,人口的健康状况却没有相应提高,这一问题越来越受到政府和公司的关注。在政府层面,联邦政府和各州政府在拨给医疗保健上的预算在不断增长。在私人层面,公司和个人在保健上所承担的费用比例也增长了。尽管目前还没有决定将什么样的 GDP 比重用于医疗保健服务是可以接受的或不可接受的,但实际情况是费用在不断增长,医疗保健部门所得的钱越来越多。随之而来的还有一些有趣的发展趋势。在 1961 年至 1997 年期间,国家健康开支相当于 GNP 的比例从 5.4% 上升至超过 14%。在同期,用于医疗保健支出的资金来源发生了显著的变化,花费这些资源的方式也有了很大的不同^[13]。

1960 年,49% 的医疗保健收入是从个体的现金支付获得的。现金支付额是指除由第三方为保健服务直接支付的份额意外的,承保人要求个人应承担的份额。1990 年,个体消费者为个人健康服务直接支付的现金为 1444 亿美元^[23],占个人保健总花费的 38%。到 1998 年,消费者用现金支付了 1837 亿美元,为个人保健总支出 5587 亿美元的 33%^[23]。

消费者在用于医疗保健服务方面所支出的比例日渐减少。个人支出的减少现已大部分转嫁至第三方,如私人健康保险公司、政府保健项目、慈善机构及其他一些资金提供方。很明显,这种保健费用从个人现金支付向其他方面转移已经造成了保健服务消费的增长。这一转变还反映出医疗保健经济学中这样一个普遍规律:对医疗保健服务服务的消费可能永远无法让人知足^[24],况且,医疗保健服务的价格不会随着消费或购买的增多而下降,这一点与其他经济部门以及他们所遵守的经济学规律大不相同。

根据 Iglehart 的观点,个人支出的下降“在很大程度上应归功于 HMO 的发展,以往 HMO 能提供很多的福利,而个人只需支付很少的现金。然而,在过去的几年中大多数的 HMO 成员需承担的支付份额上升了,这是因为雇主们和保健计划的经营者一直在寻求进一步控制费用的手段,尽管如此,在 HMO 中个人的现金支付额比起补偿性保险还是要少得多^[17]。”然而,“人均现金支付额的全面下降却掩盖了许多贫穷个人和家庭的财政困难。最近有个调查估算,超过 65 岁、收入低于联邦贫困水平(1997 年个人年收入低于 7755 美元,一对夫妇年收入低于 9780 美元)的 Medicare 受益人,其中那些同时还符合享受 Medicaid 资助的人,仍需拿出他们收入的 35% 用于医疗保健的现金支付;而那些未能享受 Medicaid 资助的人,平均需用他们收入一半现金支付医疗保健费用^[17]。”

从历史上看,公共保险计划的缺乏对健康保险服务造成了障碍。对于那些担负不起私人保险的人来说,他们所要承担的与保健相关的费用要大于大部分有能力负担私人保险的。经过长期的辩论,美国国会在 1965 年通过了法规,建立了 Medicare 和 Medicaid。Medicare 覆盖全美 95% 以上的老年人和许多残疾人。对残疾人的关怀始于 1973 年,分为两部分:住院保险和补充医疗保险。1997 年 Medicare 的补偿金总额为 2135.75 亿美元,为 36 460 143 个人成员提供服务,其中 32 164 416 人为老年人。

1996 年 Medicaid 计划总的开支为 1600 亿美元。其中用于支付为 360 多万患者提供的护理设施和家庭保健的费用总数为 405 亿美元。1996 年每个接受者的平均费用为 12 300 美元,差不多个人保健总费用的 45% 用于家庭护理,Medicaid 也支付家庭医疗保健^[13]。

自从 Medicare 和 Medicaid 实施以来,在立法和行政方面已经有了许多变化。1997 年的平衡预算法在其实施一开始,就对 Medicare 和 Medicaid 实行了最为重大的改革,包括对各州的拨款封顶和增加儿童健康保险计划。儿童健康保险计划已拨出 240 亿美元,为各州在 5 年间向 1000 多万还不符合 Medicaid 的儿童提供医疗保健。

1960 年公共计划约支付了所有医疗保健支出的四分之一(24.5%);到 1988 年这个比例增加到 42.1%。1996 年 Medi-

① GNP 是一个国家经济中商品和服务一年的总流量。大多数工业化国家现在使用 GDP,用 GDP 来衡量一个国家国内产生的所有商品和服务的价值,不管国籍程序。

M

care 和 Medicaid 总共花费在医疗保健服务上的经费为 3510 亿美元, 占全国医疗保健总费用的三分之一强。另外, 这笔费用还相当于所有公共医保费用的四分之三。纳入 Medicare 管理保健的人数有显著的增加, 从 1995 年底的 310 万人增加到 1999 年的 630 万人, 还有约 3300 万受益者仍享受传统的一次一付费的 Medicare 计划的服务。

限制处方药的范围是一个有争议的领域。处方药的花费是个人健康开支增长最快的方面, 1997 年高达 789 亿美元。此外, 处方药花费以两位数的比例增长: 1995 年增长了 10.6%, 1996 年增长了 13.2%, 1997 年增长了 14.1%^[17]。据 Iglehart 所说, 如此快速增长的原因包括: “处方药保险范围的扩大, 发放药量的增加, FDA 认可的昂贵的新药不断推出, 医药产品对消费者做的直接广告费用等。某些新药的使用减少了医院的开支, 但不足以抵消药品费用的增长^[17]。”到 2000 年, 86% 的医疗保健计划都将对适用药物种类和品名加以限制, 每年公布各自的限制要求, 对于处方药将增加应用联合支付手段^[23]。

1997 年国会旨在平衡预算而强制执行的医保预算削减已经限制了保健提供者获取政府为老年人和残疾人提供的财政拨款额。当联邦保健计划大大削减投入时 (如 1997 年《均衡预算法》的实施), 所造成的机构性或保健体系的投入水平的下降, 逐渐削弱了保健提供者提供旨在保护患者安全、扶持适当的医疗适用的可接受水平的能力。1999 年《均衡预算法》的部分修订旨在解决向医保医院门诊预期支付系统过渡, 并把拨款支付给熟练的护理机构和家庭保健代理, 用以间接的医学教育和提供若干项农村保健项目。

由第三方 (政府、私人健康保险公司等) 为个人健康保健服务支付越来越大的份额, 这种显著的转变已经造成了人们对健康保健的资金来源和成本控制的基本态度和行为。政府部门已经采取了一些措施以减缓成本和费用的增长。其中最引人注目的是 1983 年推出的以抑制医院成本和费用增长的预期的支付系统 (PPS)。通过由一个偿还支付体系对具体的诊断平均费用进行偿还支付, 来对 Medicare 向医院支付费用设置一个强制性的预期限制, 这样医院的利用率出现了大幅下降。引入 PPS 后, Medicare 所覆盖的老年患者在社区医院的人住率和住院时间都有明显的下降^[13]。

由于私人 and 政府部门都实施了成本控制策略, 医院的利用率下降了, 随之导致了病床数的减少、住院平均时间的缩短及入院率的下降^[7]。目前占主导的观点是, 不管收入来源如何, 任何患者能不住院的尽可能不住院。只是那些被证明完全有必要理由住院的患者才被接纳入院。

正如美国医疗保健体系的财政投入在政策议事日程上是一个重要的问题一样, 继续考问医保投入与产生关系也是一个重要的问题。随着开支的增长, 要求更好的界定投入与产生关系的政治分析人员、组织和政府机构的数量也急速增多。

目前在学术界和政策分析人士圈内经常提及成本效率与成本收益这两个概念。这两个概念的中心是仔细审核成本及相应的产出。Eisenberg^[26]把成本效率分析定义为对提供服务

的净支出 (开支减去省下的钱) 与所得到的结果 (即单次测得的临床结果或在一定规模下测得一系列结果) 的测定。成本收益分析将通过同一单位的成本与收益的测定来决定所用成本对于所获得益处是否值得^[26]。这样的分析是至关重要的, 因为将来政策的决定要考虑到增强美国人民的健康状况的医疗保健体系中的有限资源的收集、分配和利用。

私人部门与政府的削减医疗保健费用的策略和计划并没有摆脱人们的批评。例如 Ginsberg 认为, 医院联销保健服务盈利这一概念有很严重的缺陷, 因为他们占据的市场份额很大, 结果利润自然更大^[27]。他的这一观点基于现在用于医保的私人基金数量有限。从另一方面看, 他认为保健有可能在家庭护理领域得以增长, 另外与老年人护理相关的行业也会增长。

在美国获得医疗保健服务的途径

有权从美国医疗保健体系中获得或部分获得保健服务的个人可分为三类:

- 因特殊的权力而受到政府资助的人 (贫穷者、老年人和退伍军人)。
- 由雇主交纳保险金而享受基本医疗保健服务的雇员。
- 选择现金支付的保健服务者。

然而, 还有一些既没有具体财政资助又没有个人支付医疗保健服务费用的能力的且不符合享受任何一种权力的人。这些个人只能依赖于某种慈善机构提供的保健与服务了。另外, 还有一些因地处偏远, 根本无法享受医保体系所提供的服务的人群。这一人群十分复杂, 所处的地理位置资源有限, 需求各不相同, 为此他们对医保系统的模式与保健服务利用的要求也大相径庭。

随着医疗保健费用的增高及随之而来的保险费用的提高, 要想获得医疗保健服务而又不增加个人的开支变得更为困难。个人可接受的保健服务并非所有的项目都可在联邦的 Medicare 和 Medicaid 计划中得到报销。此外, 这两个保健计划对所提供的服务范围有非常严格的限制。类似的限制也可见于私人医疗保健保险条例。由于没有任何一个联邦计划, 也很少有私人保险计划会对无限制的长期保健提供保险, 为此除了巨富, 没有人会冒这种会造成财政崩溃的风险。

医疗保健词典中现有两个新的术语来反映下列问题: 保险不定和无保险。保险不定者可能包括工作的穷人, 即有工作但健康投保极其有限的个体, 如果他们的雇主为他们投保的话, 他们可能是低收入者, 也可能是收入略微高于国家规定的贫困线。通常他们无法享受 Medicaid 的权利, 也不具有雇主支付健康保险的福利, 又无力负担 (或不选择购买) 第三方的保险来支付医疗保健服务。

目前, 还没有向保险不足或无保险者提供资金的具体政策性计划出台。不管是作为计划中的慈善服务, 还是作为未计划中的财政亏损。1997 年全美国这类无补偿的保健费用用到 185 亿美元^[28], 相当于医院总花费的 6%^[8]。

削减的支付、高比重的无补偿保健已经造成了城市和农



村受挫地区的一些医疗单位的关闭,这使一些人在接受医疗保健方面变得更加困难。Whiteis 和 Salmon^[29]称这种现象为“公益性减资”。由于私有非营利性医院、私人诊所、药房、医生诊所等必须依赖于自己的经济实力,任何对这一基础的威胁都可能导致歇业。

无补偿保健的数量,在有严重社会问题的地区被放大,因为健康状态与社会地位直接相关。至于健康状态,我们应该在更为广泛的范围进行审视,调查整体人口的发病率和死亡率。美国人的预期寿命自 1936 年的 68.5 岁至 1996 年的 76.1 岁几乎增长了 10 岁。1996 年妇女的预期寿命为 79.1 岁,而男性的平均寿命为 73.1 岁^[11]。生活在美国的人 1996 年死亡的主要原因是^[11]:

- (1) 心脏疾病 (733 361 人死亡);
- (2) 癌症 (539 533 人死亡);
- (3) 脑卒中 (169 942 人死亡);
- (4) 肺部疾病 (108 027 人死亡);
- (5) 意外伤害 (94 948 人死亡);
- (6) 肺炎和流行性感冒 (63 727 人死亡);
- (7) 糖尿病 (61 787 人死亡);
- (8) 艾滋病 (31 130 人死亡);
- (9) 自杀 (30 903 人死亡);
- (10) 肝脏疾病 (25 047 人死亡)。

另一个测定国家健康状态的指标为新生儿死亡率,即每 1000 个活产中死亡的数量,1997 年每 1000 个活产中有 7.2 个死亡,而 1988 年每 1000 个活产中有 9.9 个死亡。总的来说,这些数字是比得上那些世界上主要的工业化国家的。

近来,美国的主要发病率集中在生活方式类疾病。这与 20 世纪初盛行的疾病形式形成了鲜明的对照。除艾滋病及其他性传播性疾病外,传染性疾病只占常见病中很少一部分。相反,与抽烟、营养不良、久坐、酗酒和消费其他化学品等与生活方式有关的疾病,再加上杀人、自杀和意外事故所造成的疾病发生率在美国却占了大多数。意义重大的预防策略可显著减少与这些医疗保健问题有关的疾病的发生、流行和死亡。

在贫困人口高度集中的区域,无保险却极需医疗保健服务的个人也同样高度集中,这一点并不令人惊讶。农村中有这样的区域,城市中也存在这样的地区。在一些由于地理位置、费用或质量等方面的原因而无法得到开业医生或其他服务提供者(诊所)的地区,急诊室成了基本医疗保健服务的主要来源。同时急诊室还为因社会环境差而造成的枪伤、药物超剂量、传染性疾病以及其他外伤的受害者提供重病护理。急诊室的大部分护理是无补偿的,因为其护理质量和数量都超过了补偿的许可度。经济受挫地区的某些外伤治疗中心已经为此而关闭^[30]。

内地城市和贫困的农村地区的医院比起通常地处较为富裕地区的盈利部门的医院来,还更关注“风险”(不付款的)患者比例的增长^[29]。实际上,富裕的医院有时将他们无法为之垫付费用的患者“倾销”给慈善保健和其他公共医院,以减少他们的财政风险。但这会增加公共或慈善医院的财政风

险。还有,在现有的计划下有那么多“风险”患者的存在,其补偿水平根本无法覆盖这些费用。为此,美国已经开始关闭医院,这在此类亏损最为明显的地区尤甚^[30]。

美国的健康政策继续努力克服与保险不足和无保险人员相关的问题^[31]。一个基于社会等级和支付能力的多层次的医疗保健体系,在一个号称无比富裕,政治上讲究民主、权力的国家是不可接受的。Ginsberg^[27]强调:尽管这些年我们做了所有这些努力,但医疗保健的费用仍不断上升……毫无疑问在保健体系中有浪费,但还没有人能提出有效的建议来夺回某些认为可以节约的约 1000 亿美元,我相信我们不会改变我们国家的健康政策程序,除非我们在一些关键问题上达成广泛的一致。如美国人是否愿意确保所有人都应有权享受医疗保健?那样的话,他们必须同意拾起另外一张数额庞大的账单,而这张账单迄今还是他们所回避的。

面对费用的限制和使用医疗保健的限制,优质医疗保健成了人们越来越关心的问题。总统消费者和医疗保健业质量顾问委员会^[32]明确表示:“医疗保健体系的目的必须继续削减美国人民因疾病、受伤和残障所带来的影响和负担,以促进人民的健康和正常生活”。根据该顾问委员会的要求,有些基本的医疗保健的特点,我们作为一个国家必须努力去实现。该委员会还为美国人民的医疗保健制定了“消费者权益与义务的指导原则”,这些原则包括:

- 所有消费者都有同等的权力;
- 质量第一;
- 对行之有效的办法要坚持下去;
- 成本很重要。

医疗保健的未来

在过去的十年中,针对美国的医疗保健体制中有关财政、进入和保健质量等问题已经有了一些进行大规模改革的建议。Iglehart 强调美国医疗保健体制是一种令人无所适从的体制。他写道^[17]:

按照许多技术标准,美国的医疗保健是世界上最好的,但该领域的领导者最近在一全国的圆桌会议上宣布“迫切需要改进医疗保健的质量”。严格的管理保健和低膨胀率已经显著地减缓了医疗开支的增长,但一项新的政府研究预测医疗保健费用将很快再次逐步上升,在今后十年中会翻倍。总之,美国这样的体制,在其运行过程中会受到两个利益迥异而时常又相冲突的目标的驱动:既要为患者提供医疗保健服务,又要为承担该财政风险的个人与组织机构带来收入。总统消费者和医疗保健业质量顾问委员会^[32]根据目前许多个体没有得到符合水准的保健服务,和有 4430 万个人没有被医疗保险所覆盖这样的现实,概括性地提出了一些美国医疗保健体制可以改进的领域。该委员会还概述了几类质量问题,其中包括可避免的错误、服务不到位、过度服务及变更服务项目等。根据这些质量问题的现实,该委员会建议最初的一套国家目标应包括^[32]:

- 减少致病、致伤和致残的潜在因素;

M

- 扩大对新治疗方法的研究及其有效性的证明;
- 确保医疗保健服务的合理使用;
- 减少医疗保健资源的失误;
- 纠正医保资源过度使用和利用不足;
- 增加医保中患者的参与度。

该总统顾问委员会正着手在公共和私人的部门开展一个消费者所拥护的运动,要求对美国的医疗保健体制进行重大改革,使更多的生活在美国的个人能够享受医保。然而,由于这些要求与以前的模式一致,为此只在政策上进一步调整,而在方向上没有什么实质性的改变。一些主要问题在很大程度上都未受到影响。尽管基础广泛的医疗保健改革的努力未获成功,但市场的力量与目的性更强的立法和调控的努力已经改变了 20 世纪 90 年代保健的面貌。

克林顿政府 1993~1994 年度的医疗保健改革计划,在理念上想提供一个雄心勃勃的计划,以消除医疗保健覆盖不足所存在的巨大问题。该计划建议保证所有美国公民和合法居民,不论其健康和雇佣状况如何,都应享受全方位的保健福利。此建议由于诸多因素,如覆盖范围的巨大、计划的复杂性及其对保健体制进行重大改革所涉及的各种政治因素的估计不足而夭折。

克林顿政府的医疗保健改革议程的失败以及随后对美国保健体制所做的修正,是与保健体制相关的政治上的重大教训。

不幸的是,自从克林顿政府 1994 年保健制度改革计划失败以后,美国无保险人员的数量有所增长。根据人口调查局的统计,有 4430 万人无保险,约占总人口的 16.3%。在这些无保险人员中,18 岁以下的占 15.4%,而比率最大的人群在 18~24 岁。西班牙和葡萄牙裔美国人占无保险人员的 35.3%,无保险总人口的 43%不是美国公民^[6]。

无保险人员的数量预计将继续增长。为了解决这一问题,已经提出了对医疗保健制度进行改革的建议,其中包括当时的克林顿总统的买进“中年”成人的建议,和议会多数党领袖 Dick Arney 的用退税方法支付无保险人员的保险金的(R-TX)计划。2000 年的总统竞选运动引发了对无保险人员增加医疗保健的覆盖面的立法辩论。这场有关如何扩大保健覆盖面的公共辩论将会激发出改进美国医疗保健体制的具有创造性的方法。然而,只有雄辩是不够的,还必须拿出真正的办法来解决问题。

医疗保健财政困境的实质与一个国家愿意花多少钱,把这些钱花在谁身上,用什么样的方法来决定费用、质量和结果之间的关系等问题有关。当科技进步在医保领域兴旺发达时,高科技医学会随着日益增长的价格而发展。还有,未在预料中的费用和复杂疾病问题(如艾滋病)会给医保系统的成本增加不可预测性。这就是说大多数决策人员知道该做什么。然而,他们在寻找合适和可接受的解决方式上却不知所措。为此,成本与开支可能继续上扬(这样也会增加用以医保的 GNP 的比率),解决办法可能变得更令人捉摸不定。

尽管有些人会提出,可用以医保开支的资源最终是有限度的,但很少人说得清这限度到底在哪里或应该在哪里。在

美国,由于科学进步在程序和技术上有了些发展,在决定谁最应该从这些科学进步中获益这样一个涉及伦理道德决策能力上却没有得到相应的发展。比如,限额保健服务或者说限制高费用服务都是出自于政治决策而非出自于慎重的公众决策。这一点在美国保健体制的 Medicaid 中得到明确的验证。

由于费用的压力继续增长,很可能重新回到让患者从自己有限的收入来源中为医疗保健支付更大的份额。这样就会采取有较高扣除率和合作保险的支付形式。可能将医疗保健的财政负担重新回归到个人身上会提高美国社会的这样一种集体意识,即在使用和支付医疗保健服务方面“没有免费的午餐”。当然,这一现象在社会福利“改革”方面已经出现。一些在该改革中取得综合成果的项目已经做出了调整,将参加者“辗出”享受福利范围,让他们参加工作。

另外,对于反映在医疗保健财政舞台上的一些问题,目前也许没有现成的解决办法。正如 Hardin 提议的,确实有一类关于人的问题没有技术上的解决办法^[33]。在引用 Hardin 的类比时,Hiatt^[34]指出:“任何一个社会用于医疗保健的资源都有限度,对于这一点没人会提出异议,也很少会有人对我们已经接近这一限度的观点加以置疑。我们面临的困境是我们如何在额外注重医疗的平等权益的同时又不至于拖垮自己。”

结论

这些是美国医疗保健体制当代的主要特征。这是一个巨大的社会结构,同时也是一个拯救者,一个庞然大物,一个使人盲目牺牲、令人置疑的标志。它当然会处于一个不稳定和不断渐进的变化之中。为此,它一直处于戒备状态,那些以此谋生与保健体系的受益者也在精心地给它指导。最为重要的是,它还需要来自那些被剥夺了保健权利的人的重大压力。

参考文献

1. Donabedian, A. Aspects of Medical Care Administration: Specifying Requirements for Health Care; Harvard University Press; Cambridge, 1973.
2. Dougherty, C. J. American Health Care: Realities, Rights, and Reforms; Oxford University Press; New York, 1998.
3. Bella, R. N.; Madsen, R.; Sullivan, W. M.; Swidler, A.; Tipton, S. M. Habits of the Heart; Harper & Row; New York, 1985.
4. Relman, A. Reforming the Health Care System. New Engl. J. Med. 1990, 323 (14), 991-992.
5. www. census. gov (accessed Oct 1999).
6. www. doc. gov (accessed Oct 1999).
7. American Hospital Association, Hospital Statistics, Health Forum; Chicago, IL, 2000.
8. Modern Healthcare, By the Numbers 1999 Edition (Supplement to Modern Healthcare), July 19, 1999.

9. www.who.gov (accessed Nov 1999).
10. Fuchs, V.R. Health Care for the Elderly: How Much? Who Will Pay for it? *Health Aff.* 1999, 18 (1), 11—21.
11. www.cdc.gov/nchs (accessed Oct 1999).
12. www.nahc.org (accessed Dec 1999).
13. www.hcfa.gov (accessed Dec 1999).
14. Quality First; Better Health Care for all Americans. The President's Advisory Commission on Consumer Protection and Quality in the Health Care Industry, 45.
15. www.NCQA.org (accessed Oct 1999).
16. Landis, N. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 1999, 56, 1392.
17. Iglehart, J. The American Health Care System: Expenditures. *New Engl. J. Med.* 1999, 340 (1).
18. New Health Care Model Balances Cost, Quality, Shifts Power to Patients. *PR news wire.* Nov. 1999.
19. www.hcfa.gov (accessed Oct 1999).
20. www.bea.doc.gov (accessed Oct 1999).
21. Schieber, G. J. Health Expenditures in Major Industrialized Countries, 1960-87. *Health Center Financing Review* 1990, 11 (4), 159—167.
22. www.phrma.org (accessed Oct. 1999).
23. Smith, S.; Freeland, M.; Heffler, S.; McKusick, D. Health Tracking: Trends. *Health Aff.* 1998, 17 (5), 128—140.
24. Klarman, H. E. *The Economics of Health*; Columbia University Press; New York, 1965.
25. www.hcfa.org (accessed Oct. 1999). Medicare + Choice; Changes for the Year 2000 Executive Summary.
26. Eisenberg, J. M. Clinical Economics: A Guide to the Economic Analysis of Clinical Practice. *JAMA* 1989, 262, 2879—2886.
27. Ginsberg, E. N. For Profit Medicine: A Reassessment. *New Engl. J. Medicine* 1988, 319 (12), 757—761.
28. www.aha.org (accessed Nov 1999).
29. Whiteis, D. G.; Salmon, J. W. *The Corporate Transfer of Health Care*; Baywood Publishing Company; Amityville NY, 1990.
30. Christianson, J. B. *Institutional Alternatives to the Rural Hospital.* *Health Care Financing Review* 1990, 11 (3), 87—97.
31. McLennan, K. *Care and Cost. Current Issues in Health Policy*; Westview Press; Boulder CO, 1989.
32. Quality First; Better Health Care for all Americans, The President's Advisory Commission on Consumer Protection and Quality in the Health Care Industry.
33. Hardin, G. The Tragedy of the Commons. *Science* 1968, 162, 1243—1248.
34. Hiatt, H. H. Protecting the Medical Commons: Who is Responsible. *NEJM* 1975, 293, 235—241.
35. Quality First; Better Health Care for All Americans, Final Report to the President of the United States. The President's Advisory Commission on Consumer Protection and Quality in the Health Care Industry.
36. To Err is Human; Building a Safer Health System, Institute of Medicine. National Academy of Sciences, 1999.
37. Kronick, R.; Todd, G. Explaining the Decline in Health Insurance Coverage, 1979—1995. *Health Aff.* Mar/April, 1999, 30—47.
38. Merrill, R. A. Modernizing the FDA. An Incremental Revolution. *Health Affairs*, Mar/April, 1999; 96—111.
39. Robinson, J. C. The Future of Managed Care Organization. *Health Affairs*, Mar/April, 1999; 7—24.
40. Grunback, K. Primary Care in the United States-The Best of Times, The Worst of Times. *New Engl. J. Med.* 1999, 341 (26).
41. Smith, B. M. Trends in Health Care Coverage and Financing and their Implications for Policy. *New Engl. J. Med.* 1997, 337 (14).
42. Vladeck, B. C. The Political Economy of Medicare. *Health Affairs*, Jan/Feb, 1999; 22—36.

(蔡培林 杜敏琼 译)



M

美国以外的医疗保健体制

Albert I. Wertheimer

Temple University, Philadelphia, Pennsylvania, U. S. A.

Sheldon X. Kong

Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, New Jersey, U. S. A.

引言

由于所处国家的不同,世界上各国的医疗保健服务会在组织、结构和融资方面呈现出如此大的差异,这一点十分令人关注。有人可能认为,国家领导和决策者们将会注意到彼此间的医疗保健体制,并通过仿效优点,使医疗保健体制趋于一致并更加类似。

实际上,这样的设想是错误的。每个国家的医疗保健体制是大不相同的,和很多可变因素密切相关^[1]。事实上,一个国家的医疗体制犹如一面镜子,反映该国社会功能大体运作的情况。医疗保健运行体制必须与以下几方面相适应:①经济体制。包括社会主义、资本主义或混合经济体制。②政治体制。政府中央集权程度起主要作用还是次要作用。③国力。包括初级保健设施的使用情况,医疗专家及三级保健设施服务的获取程度。④传统和习俗。历史证明,这类基本的、可见的事情是难以改变的。⑤地理情况。是大部分人口集居在少数的大城市中,其余的散居在乡村;还是人口分散居住在数百个岛屿上。⑥基础设施。包括道路、通信系统和航空服务;⑦对高科技的认同度和发展程度^[2]。

此外,还有其他因素,如来源于早期殖民势力体制的影响、文化教育程度、他国的邦交关系等。

背景

本章分析了医疗保健运作体系在六个不相同国家的情况。即便是美国和加拿大,这两个拥有大片领土接壤、语言相通且达到充分沟通的邻国,他们的保健运作体系也大相径庭。尽管一边清楚地意识到另一边发生的事情,但是由于一系列复杂和强权的影响,他们还是泾渭分明地按着自己的方向发展。

本章简要地列举了六个国家,以此来强调各国的保健服务和财政措施的惊人差异。本质而言,大多数国家的保健体制分为以下几个模式:

(1) 国家所有和控制。最好的例子就是英国国家医疗服务体制和瑞典体制,在该体制下,诊所、医院和绝大多数可提供的医疗服务由政府所有和控制^[3]。

(2) 国家医疗保险计划。在该模式下,政府是唯一的或主要的支付者。但是,有一些设施和资源不在政府掌握

中。该模式可见于欧洲大部分地区^[4]。

(3) 混合体制。该体制见于亚洲和中美洲大部分地区,并通常见于那些高薪阶层较少、低薪阶层占多数的国家或地区。低薪阶层接受公共设施的服务,高薪阶层则使用私有的、收费和自费的服务。

另外一种情况也适用这种类型。美国有一些独立的医疗保健系统,包括现役军人、退伍军人、由联邦政府资助的以患病穷人为对象的医疗补助联盟、为65岁(含)以上老人设立的联邦保险计划、赢利的和非赢利的私人诊所、连锁医院、健康照顾团体、宗教、监狱健康保健和大学教学资源^[5]。

(4) 私人专有体制。由于各国意识到健康的维持和疾病的预防对实现国富民强的目标是非常重要的,因此,该模式的应用地区正在缩减。瑞士还在沿用这种私有制的形式,在该国,大多数的健康保健资源由私人掌控^[6]。

国际实例系统

1. 加拿大

1.1 机构

加拿大实行国家健康保健服务体系,向国民提供医疗服务。其各个独立的省政府实施符合国家法律但可以在很多方面有所差异的健康计划。这类医疗保健体系保证了医疗服务的广泛性、普遍取得性、便捷性和公共管理性^[7]。

加拿大健康机构是国有化的联邦卫生机构,然而提供医疗服务工作则是委派省政府操作的,事实上控制着100%的加拿大医院。加拿大实行一种以“守门人”为起点的基础健康保健系统,由普通开业者或提供基础医疗的家庭医生提供服务,包括看专科医生、做诊断性试验、住院治疗等,贯穿全过程。公民个体拥有选择医生的自由,这些医生中的95%是自负盈亏、自主经营的。省政府给这些医生按次付费。

个别的省政府还提供不同的补充福利,这类福利并不包括国家医疗照顾方案中已有的对穷人、老人和其他特别团体提供的如药物、牙科护理、眼科护理等项目^[8]。对典型的、有工作的、壮年人提供的补充福利则来自于私人购买的补充健康保险。



1.2 药物

加拿大在 1987 年成立了专利药品价格审查委员会 (PMPRB), 以保证该国的药物价格不会过度溢价。委员会负责检查开出的处方和非处方药物的价格, 并向药物制造商们出版年度指南。药物制造商们志愿遵守专利药品价格审查委员会的指南; 但是, 自 1993 年起, 委员会有权削减过度溢价, 将剩余价值上缴国家, 并对药物制造商们实施处罚。

专利药品价格审查委员会将加拿大的药价与其他七个工业化国家 (法国、德国、意大利、瑞典、瑞士、英国和美国) 的价格进行比较, 以确定本国的药价与其他国家相比是否合理。但也存在着一定争议, 那就是, 新开发药品的价格并不像现有药品的价格那样得到很好的控制。

对药物进一步的控制在省府一级, 每个省拥有一个包含补偿水平的药典, 作者注意到, 魁北克省的药典上几乎罗列了所有的新药, 相比而言, 安大略省的药典对罗列已核准新药品的动作则比较缓慢。每个省都对机制有补充的控制。安大略省要求首选普药的成本至少要比专利药品的低 40%。部分参考价格系统的成分则参照英国、哥伦比亚和纽芬兰。

尽管各省份间协调发展的程度正在增强, 但是在非卧床护理方面, 仍没有一个国家的、标准化的、通用的药品单子。在医院, 被管理的药物是由医保支付的。每个省份的药物受益计划有着各自有趣而又不同的特点。

爱德华王子岛的计划是支付给年长者, 福利受益人, 在家中接受治疗的患者, 风湿病、糖尿病、肺结核、多发性硬化病、艾滋病患者等。新布鲁斯威克每年一次为年长者、器官移植者和其他选择类别的患者提供优惠付费政策。每次大约从 9 美元起 (加拿大), 每年最高限额为 750 美元, 但魁北克的一些团体则放弃此政策。

加拿大机制其他有趣的特点包括于 1998 年与欧盟达成的互相承认协议、禁止向消费者做处方药的广告、20 年的专利保护期、确立专利药品价格审查委员会的权威以保证药品定价的公平^[9,10]。

2. 南非共和国

2.1 机构

南非共和国的医疗保健环境的差异是最大的, 在富有的城市, 其运行和设施具有世界级水平; 而在偏僻贫穷的乡村, 只有一些最原始的保健措施, 两者存在巨大的差异。现在, 非洲民族会议把基础保健作为关注的焦点, 并致力于采取相关措施来纠正早期种族隔离政权体制下形成的那些忽视的问题和不民主的痼疾。公共卫生服务的范围在资源允许的情况下, 正以尽可能快的速度向黑人居住的城镇扩大^[11]。

然而, 南非面临的最普遍的问题就是, 事实上缺乏资金投入用于抵御艾滋病感染的新药研制。为最大化地增加

药物预算的价值, 南非已通过立法为公共部门创建了一个基本药物清单, 包括普药的替代授权, 以革除药剂师的职业特权, 并制定法律允许在南非注册已满两年的类似药品可以准许进口。很明显, 这些保存的资源可以使更多的患者获益, 但同时也触犯了本国和跨国制药公司的利益。

南非仍是非洲最富有的国家之一, 其 1997 年的国内生产总值大约是 1300 亿美元。然而必须指出的是, 总数背后隐藏着巨大的种族差异。尽管南非在进步, 但是黑人的生活水平只比邻近国家的稍好一点, 而白人的生活水平却与北美或西欧国家接近。超过 30% (其中大多为黑人) 的失业率加剧了国家财政状况的恶化^[12]。

为了符合世界卫生组织推荐的计划, 对儿童实施常规的免疫管理是政府的一项政策, 但却未能在全国范围内铺开。包括艾滋病病毒在内的传染性疾病仍是严峻的挑战。因为缺乏精确的人口普查数据, 所以难以对资源的分配进行计划和预算。该地区保健费用的总支出大致为每人每年 300 美元, 据估计其中私人部分超过总支出的 50%。

公共卫生的支出主要用于一级保健, 近来也用于三级保健。私人部分的花费主要用于私立“医疗项目”中。这些是非赢利组织, 由雇主联盟和从业人员提供资助。有接近 200 个项目向大约 300 万工人及 500 万家属 (据估计南非总人口为 4000 万) 提供保险和支付医疗费用。医疗项目中最大的一块支出用于药物, 从而引发了药物定价的压力, 在下文中将有所提及。除药物以外, 接下来的另一大块支出用于私人医院、医疗专家、普通开业者和牙医^[13]。

南非医疗保健部门彻底进行了重组, 将原来种族隔离体制下划分的人种和地方区域的健康保健系统, 改组为协调的国家医疗保健系统, 并通过划分保健分管区和地方行政保健区来加以管理。尽管如此, 在知识、教育、期望值以及财富在种群中的分布等方面还是存在着极大的差异^[14,15]。

2.2 药物

直到最近, 药物制造商们仍可以随意给药品定价, 批发商和零售商再把他们选中的药物加价到零售价。在 1997 年, 一项延伸至零售商的价格提议获得通过, 但却遭到了来自药物制造商协会的抵制。法律规定了定价委员会成员由卫生部来选择, 由其决定每种产品的价格和最高价, 公共部门的一级保健药物 100% 由政府承担, 住院患者的门诊药费部分自费, 基本药物清单将是未来公共设施提供的核心。然而, 要在达到大多数药剂完全能够在基础保健中心或公立医院得到的基础上推行该项政策, 尚需一定的时日^[13]。

与南非注册的药物在国外能以更低价格取得这一事实具有相同重要地位的事实是, 药物制造商协会的起诉是基于与 1997 年的药品法产生冲突的这样一个基础。另外, 除了定价委员会以外, 南非医疗保健部门竭力倡导使用普药也被证实是产生冲突的源头。新立法条例的其他特征还包括: 禁止向药剂师发放样品或回扣; 在药物营销环节建立

M

职业道德标准；推行一系列安全制度，从根本上限制合格的执业从业者的权限。

新药获得批准的一条捷径是该产品早已在英国、加拿大、美国、瑞典或澳大利亚当中的任何一个国家中使用。尽管有大约 85% 的药品（按市价估计）在近 3000 家的药房销售，但是大约 80% 的人口仍然靠从公共部门（如诊所、医院、基础医疗哨所或战地医院等）取得药物。虽然药物有 20 年的专利排他保护期限，但进口同样对其保护措施形成了有效的冲击。

在未来几年，尤其是在承诺遵守知识产权和世贸组织相关政策、规则的背景下，南非政府实施在药品、价格控制和提高质量等方面的措施将产生何种内部影响？南非未来的前景又将如何？对此，我们将拭目以待^[16]。

3. 日本

3.1 机构

日本是世界第二大药品市场，仅次于北美而位于西欧之前，其 1.26 亿的人口每年消耗价值 700 亿美元的药品。每一个日本居民年均用在健康保健上的花费达到了 2000 美元，其中有 550 美元用在了药品上。日本市场的根本特征可能就是老年人比例超过世界平均水平和药品的消费量高于正常消费水平。据估计，在 2050 年前，65 岁以上的老年人比例将接近 30%。高消费率在一定程度上归因于医生售药、习惯性用药等，从而增加了去诊所看病的总费用^[17]。

日本健康保健的资金基本来源于为在职雇员提供的社会保险系统，其支付比例约为 55%，为老年人设立医疗机构支付比例为 35%，剩下部分由自费和一小块公共保健和疾病预防补助加以弥补。卫生福利部全权负责国家医疗保健工作，履行相关职责，下设许多机构。对其相当多的批评意见源于其规定的难以理解和诠释、条例的交叉重叠、对欲进入本国市场的外国公司的“壁垒”措施等。比如，在日本，医生要通过批准才能有权拥有和运营医院，有效地排除了企业主或未获行医资格的医师^[18]。

普通健康保险制度建立于 1961 年，它几乎覆盖了全部的人口，包括从业者、失业者、退休人员 and 业主。员工支付 10% 的治疗费，当费用超过每年的限额后，由一部分保险金和其老板为他们支付超额部分。

3.2 药物

卫生福利部制定补偿用药（由社会保险系统核定）的价格，医生、诊所和私立医院所得补偿略微高于他们实际的取得成本。政府有一个补偿价格的年度削减计划，以减少医生由此来源而获得的额外收入。患者自费部分为 20%，尽管有关减免儿童和低收入老年人费用的计划被搁置了，但是最近一项有关免除 70 岁（含）以上老年人费用的计划已被提出。

卫生福利部削减现有药品价格的 5%~10% 的措施产生了与预期恰恰相反的结果。医生在处方中开出了更多最新

的、尚未被列为减价范畴的高价药，从而在实际成本和补偿价格的差额中获取了更大的收益。

在普药方面，精明的观察家相信日本政府希望本国的研发密集型企业获得成功。有规定要求普药的价格不低于创新商标药价的 40%。合理的设想是，让医生在普药上获得更低的赢利，如同规划价格参考那样在未来一直持续^[19]。

日本药典颁布官方标准，设立不同的政府部门，履行食品及药物管理局的各项职责。据说在不久的将来，日本将建立一个类似于西方国家模式的食物及药物管理局。

最令外国和跨国制药公司厌烦的一项规定是，在日本要再次进行人体临床试验，因为外来的试验数据不被认可。而有趣的事实是，日本与韩国和中国台湾一样，其处方权和售药权是一起的，没有分开。被称为“Bungyo”的是医生和诊所的主要收入来源。药房只有不到 20% 的处方流通量^[19]。

1993 年出台了《规范市场后行为的监督管理办法》。营销后的运行报告要提交政府部门。《规范市场后行为的监督管理办法》和定期安全报告制度都要求产品在获准进入市场后，马上要进入复查阶段，并在此阶段每年要提交产品综述。与美国做法不同的是，当一项新药在日本获得无限期使用批准后，要进行周期性的完全再评价，再评价是 5 年一个轮回，在前一个再评价结束后，新的再评价再次开始进行。

药品主要由 2 000 个批发商经销，另外还存在着一个药品直达医院、普通从业者和药房的第二渠道——总计约 66 000 家的药房，其中多为独立经营的家庭药房。除此以外，还包括连锁店。然而，越来越多的非处方药也能在便利店中购买到。

医生把卖药给患者作为一项非常有利可图的副业，在此动机下给患者开尽可能多的最昂贵的药，因此非处方药的市场空间很小。除了关注药物的落后状况外，药物环境在日本也很混乱。每隔一段时间，就有人呼吁要求把处方权和售药权相分离；但是，由于有强大的势力支持，似乎不太可能在近期改变^[20]。

4. 英国

4.1 机构

英国是世界上最富有的国家之一，人口超过 6 000 万，人均 GDP 比美国多 22 000 美元。它是七国集团、欧盟和经合组织的成员国。

1996 年，英国用于医疗保健的支出大约占全部国内生产总值的 7.0%，用于国家医疗卫生服务的公共支出占了健康保健支出的大部分。国家医疗卫生服务成立于第二次世界大战以后，目的是为了统一由自发人士和地方医院进行的医疗保健服务，国家医疗卫生服务向全体英国居民提供免费的医疗保健服务，其资金来源于多种税收。

英国的医疗保健系统具有两大主要特点：健康权威部



门负责医院的医疗服务,普通从业者公债持有人负责基础的医疗服务。在1996年,100家健康权威部门在英国有有效运作,负责各地医院和医疗社区的卫生保健服务,其范围覆盖了英国本土上从12.5万到超过100万的人口。医院服务分为四个等级。社区级别:社区医院对急症、康复期、慢性病及临终期的患者提供最基本的医疗保健服务,普通从业者是该级别的主力军。地方级别:一般地方医院负责关键的急症病例,向平均25万人口提供服务。地区级别:主要提供专业服务,如神经外科、胸外科和放射线治疗等。国家级别:由高等专科医院向部分地区或全国提供的复杂的医疗服务^[21]。

普通从业者是医疗保健系统的守门人和持有人。持有的原则就是普通从业者可以自行管理预算,他们能够从医院和治疗患者的有限服务的级别中,尽可能地削减成本。在20世纪90年代后期,普通从业者的持有人加入了初级保健集团组织。这个普通从业者的保健组织网络覆盖了平均10万人口的广大的地域。在1999年,在英格兰和威尔士有481个初级保健集团组织,他们拥有统一的预算(如药品、医院治疗服务)。同在美国有小规模人口的卫生维护中级组织一起,初级保健集团组织对患者健康保健和在外方集中选择药品等方面都有着非常广泛的影响。

4.2 药物

在英国,其监管机构是卫生部隶属的药品管理处,管理处的职责包括药品审批、临床试验审批、药品禁忌和药品安全、医药信息的畅通和提供、监察设施的使用、规章制度和英国药典的执行。英国是欧盟相互认可程序的参考成员国,欧盟药品注册系统于1995年在各国中发挥功能,旨在协调整个欧盟的药物法规。集中注册程序由欧洲药物评价处进行。药品被集中注册程序通过后,就可立刻被欧洲所有成员国认可。非集中注册程序以相互认可程序原则为准。与非集中注册程序不同的是,在集中注册程序下,药品在一个成员国中获准注册后,该申请还可以在一个或多个成员国中所使用^[21]。

多数药品是通过批发商来分配给零售商的,大的连锁药房正主导着市场,在英国大约有11 000医药团体^[21]。近年来,越来越多的医药服务可以在超市获得,成为当地独立的一块医药费用。

1999年,英国的医药品花费总量约86.5亿英镑,约占总健康支出的17%^[21],国家医疗卫生服务内容涵盖了开药,但政府不承担非处方药物的补偿。卫生部间接控制药品价格。由于价格控制对利润控制的影响程度高于对个别品种价格的影响程度,因而在英国,药品的价格相对而言是免费的。政府操作非补偿性药品的清单。绝大多数有许可证的处方药是全补偿的。但是,约束成本和处方预算意味着普通从业者经常开普药,结果造成了在英国新的处方药的推广速度比美国慢。近来有报道说,国家资深临床协会(NICE)将对欲在英国推介的新医药品设置更多的门槛。

4.3 国家资深临床协会

成立于1999年的国家资深临床协会由政府投资组建,它是英国特殊健康的专业权威机构,也是国家医疗服务制度的一部分,旨在“为国家医疗服务(包括患者、健康专业人士、公众)在目前最为行之有效的实践中提供权威的、有活力的、可靠的指导意见”。它的关键作用是“评价临床的获益,干预医疗保健的成本,并形成建议报告”。每次对评估的指导意见都建立在国家医疗服务的临床获益性、成本效益性和总体经济影响性的基础上。政府并不一定要拥护国家资深临床协会对那些健康保健提供者在指导和财务支出方面的意见,但是许多人相信,国家资深临床协会的否定评价,对其在定价、补偿及评估产品销售等方面都将有不利的影响,且影响范围不仅在英国,而且将波及至整个欧洲、澳大利亚和加拿大。

指导包含两个方面:个人健康知识(包括药学、医药设备、诊断技术及手段、健康促进)和特殊情况下的临床管理。协会可以对特殊病状或特定患者推荐一种普通使用技术。在评估的基础上,治疗干预(如药物)将被分为三类别:A类——国家医疗服务的常规使用;B类——需要进一步试验;C类——非国家医疗服务推荐的常规使用。

国家资深临床协会的董事会专门反映医学专家、患者、使用人群、国家医疗服务经理和研究部门一系列的见解。董事会确信国家资深临床协会的运行最大限度上发挥了国家医疗服务的有效性。如想了解具体的评估步骤和评估委员会成员信息,可登陆国家资深临床协会的网址(www.nice.org.uk)进行查询。由于国家资深临床协会在本章结束时才刚刚成立,其对医药工业的影响目前还难以评价。

5. 德国

5.1 机构

德国是世界上最大的经济和健康保健市场之一,在1998年,其人口约为8200万,人均国内生产总值超过26 000美元。在对健康事务高度的公共意识下,全体国民的总体健康标准也很高。德国人的寿命是世界上最长的。在1997年,德国男性的平均寿命为74岁,女性为80岁,大约15.8%的人口已超过了65岁。按此测算,到2020年,德国60岁以上的居民的比例将达到28.2%^[22]。

1997年,德国的健康支出总量是2980亿美元,相当于国民生产总值的14.2%。德国的健康保健系统是非集权式的,其健康保健指出有多种经费来源和付费人。法定保险体系在全部份额中的占比最大,其份额近50%;剩下的50%则由雇员、政府预算、住户、私人保险、退休保险、意外保险等占据。最大的支出是医院费用,占了法定保险体系指出总量的34.3%^[22]。

在德国,联邦政府在提供健康保健中所承担的行政职责微乎其微,其主要是制定调整的框架,让私人机构(individual lander)运行。私人健康机构负责实施联邦立法,



制定自身条款, 监督管理下属部门的权限、医学的专业性、医院的规划和区域的管理。

德国医院按所有制形式可被分为三大主要类型: 公有制、非赢利制和私有制。在 1997 年, 公有制部分操控了大约 40% 的公立医院, 非赢利部分则操控了另外 40% 的公立医院。然而在过去的十年中, 私有制的数量在稳步上升。

在过去的十年中, 开业医生的人数稳步上升。超过 70% 的开业医生是某方面的专家, 其中大多数为一般内科; 另外不到 30% 的从业医生则没有任何的专业领域。

5.2 药物

德国是欧盟药品登记系统的参考成员国。欧洲医药评价署处理各国集中和非集中登记程序事宜。当一个含有新活性成分的产品在一个国家通过市场核准后, 根据互相认可程序, 其他成员国也必须认可。互相认可程序对延伸产品和普药产品也是强制性的。德国的市场核准有效期为 5 年, 每隔 5 年要更新审批一次。

德国是一些主要的跨国制药企业的母国, 如 Aventis、巴斯夫、拜耳、Boehringer Ingelheim、莫克和 Schering AG。VFA 是建立在研究基础上的制药协会, 而 BPI 则代表着中小型规模企业。因为北美是世界上最大的药品市场, 许多 VFA 制药公司将核心运营业务建立在美国。对许多德国制药公司来说, 向西欧国家出口是其主要的收入来源。

德国的药品市场是世界上最大的市场之一。以人均用药量计量, 德国对药物的消费仅次于日本而排在第二。德国药物基础的分销渠道是公立零售药房和医院药房。在 1998 年, 在德国 47 322 名药剂师, 相当于每千人中有 0.6 个^[22], 公立零售药房雇佣了 96% 的药剂师, 其药品主要从批发商那儿获得。处方药, 包括品牌药和普药, 只能凭医生的处方在药房配药。德国的普药市场在西欧是最大的, 其发展速度也是最快的, 大约占欧洲整个普药市场的 1/3。非处方药分为重叠的三类: 药方非处方药、非药方非处方药和可以通过所有的零售渠道 (如保健食品店、超市和其他零售渠道) 任意获得的非处方药。

6. 墨西哥

6.1 机构

墨西哥是一个拥有 31 个州和 1 个联邦区的联邦共和国。根据官方估计数字, 在 1997 年, 其人口为 9700 万。在 1998 年, 人均国民生产总值约为 4400 美元。作为发展中国家, 传染病仍是其主要的死亡病因, 虽然在过去的十年中慢性和退行性疾病正成为主要的死亡病因。

政府面临的一个主要挑战是如何致力于建设不健全的墨西哥医疗保健体系。大约有 1000 万人口无法享受基本医疗保健服务, 另外有 2000 万人口无法得到足够的医疗服务。在 1996 年, 墨西哥在健康保健的支出大约占国民生产总值的 4.6%, 其中由公众支付的比例大约是 60%^[23]。

墨西哥健康保健体系由三个部分组成: 公共部分、社

会保障部分和私人部分。公共部分主要由健康部直接指挥操作, 该部分的健康服务隶属健康部, 并由 200 多个地区协调运行。联邦地区部门为墨西哥城的 320 万人口提供健康保健服务。墨西哥社会安全协会团结工程则负责其余分布在乡村的 1000 人口。

社会保障体系为公务员提供医疗服务, 它由公务员社会保障协会负责。墨西哥社会保障协会则负责私企员工的医疗服务。两个体系拥有各自的医院和诊所网络, 提供相似的服务。现存的其他一些更小的社会保障机构, 则为一些特殊的团体提供医疗服务, 如陆军、海军、国家石油企业职工。

私人 (商业) 部分包括私立医院、行医办公室、传统医药从业者。一些慈善机构如红十字会也在墨西哥健康保健体系中发挥着一定的作用。

6.2 药物

在墨西哥, 进行调控的权威机构是 DIGECIS。健康部负责药品注册。新药要想进入墨西哥市场, 必须通过第 III 期临床试验, 以证明其安全性和有效性。所有主要药典 (如国际药典、美国药典、英国药典、法国药典、瑞士药典、欧洲药典和日本药典) 在墨西哥都可被接受。

大多数墨西哥的制药厂是跨国制药公司的全资子公司或注册的附属公司。墨西哥的药品出口增长迅速, 主要销往拉丁美洲国家, 但美国仍是墨西哥主要的药品进口国。

墨西哥药物的价格受政府调控。私人部分大约占市场总量的 85%。处方药占据了药物市场的大部分, 而抗生素则在其中占有最大的份额之一。由于对普药的使用刚刚兴起, 大多数处方药仍是品牌药, 非处方药大约占了整个药物市场的 1/5。

总结

综上所述, 这六个代表国在组织、融资机制、目的和提供结构等方面具有巨大的差异。事实上世界上几乎没有相同的体系, 因为体系代表了那个国家的价值观、优先权、政治和经济的倾向、传统。如果存在一个完美的体系, 那么我们将看到移民趋向那个模式。可是因为没有, 我们可以合理地假定, 世界上大多数不同的体系在它们的基础和大体水平上至少是令人满意的, 即便一些具体的操作条款不总是尽如人意^[24]。

世界上充满了有趣的另类途径, 以至于一大群研究该问题的学者们希望能够探索得更远。其中有一些途径包括在挪威使用的“需要条款”, 例如在那里, 他们的食品及药物管理局有权拒绝接受和再评价一个新药, 因为挪威市场上已经有六个苯 (并) 二氮。食品及药物管理局认为足够了, 除非申报公司有新的发现或使用途径有其他的突破口。瑞典于 1970 年把他们国家那时存在的药房全部买下来, 使分配渠道和服务水平合理化, 创立单一的主体和制药商在价格制定上进行谈判。法国和其他国家把新药放入一些补偿种类中。很明显, 对患者来说, 抢救药属于 100% 补偿的类别, 大多数



其他的药则争取进入 70% 补偿的类别中, 可是如果制药商和社会保障局在价格上不能达成满意的结果的话, 药品将被置于只获得较低补偿的类别中, 这将有力地牵制其在市场上的作为。这是政府平抑药价的一个强有力的筹码。

亲眼看到这个领域的未来发展是一件非常有趣的事。我们可以看到怎样从以前用药必须有医生的处方到现在向非处方药的模式推进; 那些利润并不巨大的营养制品、中草药、同种疗法和自然疗法的药物是如何地使临床试验以及产出数据随机化。同样地, 我们也能确定, 当中美洲和中东国家决定控制医药, 结束人们实际购买的任何药品都没有医生的处方的现实后, 这将多么激动人心。在不久的将来, 在遥远的东方将出现药房和医院分离, 这将引起更大的震动, 有人为之欢欣鼓舞, 有人则为之极度苦恼。

如果逻辑推理成立, 那我们预测在将来当此最佳选择形成的时候, 对开药者会有一个趋利刺激, 他们会开有高回扣的药, 从而抑制了患者和医师的利益 (在自费和补偿中形成的差异)。无论实际结果如何, 这一点都将引起学者极大的关注。

参考文献

1. Roemer, M. I. *National Health Systems of the World*; Oxford University Press: Oxford, UK, 1993; 2, 61.
2. Fry, J.; Farndale, W. A. J. *International Medical Care*; Washington Square East: Wallingford, PA, 1972; 367.
3. In *OECD Health Systems: Facts and Trends*; OECD: Paris, 1993; 100—161.
4. Hewitt, M. *International Health Statistics*; Office of Technology Assessment, U. S. Congress; Washington, D. C., 1993; 76—86.
5. Elling, R. H. *International Health Perspectives*; Springer: New York, 1977; 4, 17—25.
6. Joseph, S. C.; Koch-Weser, D.; Wallace, N. *Worldwide Overview of Health and Disease*; Springer: New York, 1977; 7—43.
7. Korman, R. A. *Academic Reference Manual*; Canadian Health Care Information; IMS Health: Mississauga, Ontario, 1999; 80—162.
8. *World Pharmaceutical Markets*; Canada; Espicom Business Intelligence; Chichester, UK, May, 1999; 9—48.
9. Alleyne, G. A. O. *Health Statistics from the Americas*; Pan American Health Organization; Washington, DC, 1998; 17—37.
10. Alleyne, G. A. O. *Health in the Americas*; Pan American Health Organization; Washington, DC, 1998; 1, 325—337.
11. Monekosso, G. L. *Eighth Report on the World Health Situation*; African Region; WHO; Brazzaville, 1994; 2, 2—37.
12. Nokagima, H. *Eighth Report on the World Health Situation*; 147—165 *Global View*; Geneva, 1993; 1, 37—59.
13. *World Pharmaceutical Markets*; South Africa; Espicom Business Intelligence; Chichester, UK, Feb 1999; 3—13.
14. *World Development Report 1993*; World Bank; Jamison, D. T., Ed.; 108—170 *Oxford University Press*; Oxford, 1993; 3—65.
15. *World Tables 1995*; World Bank; Washington, DC, 1995; 22—66.
16. Basch, P. F. *Textbook of International Health*; Oxford; New York, 1990; 144—326.
17. *Bartholomew's Mini World Factfile*; Harper Collins; London, 1995; 44, 102, 175.
18. *Eighth Report on the World Health Situation*; Western Pacific Region; World Health Organization; Manila, 1993; 7, 79—83.
19. *World Pharmaceutical Markets*; Japan; Espicom Business Intelligence; Chichester, UK, Jan 1999; 10—23.
20. *SCRIP*; London UK, 1998, 1999, and 2000.
21. *World Pharmaceutical Markets*; United Kingdom; Espicom Business Intelligence; Chichester, UK, Feb 1999; 17—70.
22. *World Pharmaceutical Markets*; Germany; Espicom Business Intelligence; Chichester, UK, Feb 1999.
23. *World Pharmaceutical Markets*; Mexico; Espicom Business Intelligence; Chichester, UK, Feb 1999.
24. Brudon, P. *The World Drug Situation*; WHO; Geneva, 1988; 7—108.

进一步阅读

- Alexander, T. J. *Internal Markets in the Making: Health Systems in Canada, Iceland, and the UK*; OECD: Paris, 1995.
- Saltman, R. B.; Figueras, J.; Sakellarides, C. *Critical Challenges for Health Care Reform in Europe*; Open University Press; Buckingham, UK, 1999.
- Schneider, M.; Dennerien, R. K.; Kose, A.; Scholtes, L. *Health Care in the EC Member States*; Elsevier; Amsterdam, 1992.
- Spivey, R. N.; Wertheimer, A. I.; Rucker, T. D. *International Pharmaceutical Services*; Haworth; Binghamton, NY, 1992.
- The Use of Essential Drugs*; 6th Report of the WHO Expert Committee; WHO; Geneva, 1995.
- Van de Water, H.; Van Herten, L. M. *Health Policies on Target*; THO Prevention and Health; Leiden, 1998.

M

免疫分析

Stephen G. Schulman

G. J. P. J. Beernink

University of Florida, Gainesville, Florida, U. S. A.

引言

免疫分析法是将小分子(药)或大分子与生物源性抗体进行选择、可逆的结合,致使生物药物分析领域发生了巨大变革。免疫分析技术可用于测定少量被测物,它们在以前采用其他技术是无法在生物基质中进行测定的。自从 Berson 和 Yalow 等对胰岛素进行开创性分析后^[1],免疫分析法被广泛用于测定多种药物、杀虫剂、激素和生物蛋白质。免疫分析法的程序相对较为简单,以致建立了很多“试剂盒”式的免疫分析系统,可用作家庭常规诊断。

在免疫分析中用作反应物的抗体通常是免疫球蛋白 G(IgG)型分子,通过哺乳动物的白细胞应答外来异物而产生。脊椎动物经过百万年的进化历程,其免疫球蛋白已进化成具有精确识别功能的器件,可以识别分子间微小的差别。例如,一只小鼠可产生上百万不同的特异性免疫球蛋白,这些免疫球蛋白可以与激发产生它们的物质(抗原)特异性地结合,从而引发将外来抗原清除出机体的过程,这也正是免疫过程的最终目的^[2]。

这些分子是异质性、具有双官能团的糖蛋白,其多肽组分中的可变氨基酸序列使其具有生物活性。多肽组分是由两条重链(也称 H 链,50 000 Da)和两条轻链(也称 L 链,20 000 Da)组成,二者通过二硫键结合。抗体分子的两个结合位点在多肽链的氨基末端^[3]。将外源性抗原注入宿主动物体内所产生的抗体具有结构异质性,以不同的结合强度和专一性与同一抗原结合。如果产生抗体的红细胞能够被分离出来,并置于纯的培养物中,则只能产生一种特定的抗体结构^[4]。由纯的细胞培养物中获得的抗体称作单克隆抗体,它们具有同质性,仅与一种或几种关系相近的抗原反应。那些在培养物中生长且能生成抗体的细胞是通过细胞融合技术产生的,可生成免疫分析所用的优质抗体,因为这些抗体具有相同的特异性和结合强度。抗原的相对分子质量必须达到 10^4 以上,这样才能产生抗体。但是,小分子(如药)可以与大分子载体结合,一些由此产生的抗体可以与药物(半抗原)应答。

所有的免疫分析程序都是利用抗原-抗体之间的特异性反应,其中包括直接或间接测定抗体(反应物)和抗原(被测物)之间的结合程度。通过对抗原或抗体进行标记,可以使用仪器测定分子浓度。标记物是能够在电化学或酶活性反应方面赋予与之结合的抗体或抗原以测量信号(如放射性、荧光、化学发光)的实体。抗体结合程度的测定包括测量被标记的结合型和游离型抗原或抗体的含量。通

常以结合型与游离型浓度比(b/f)来表示,该值与被测物浓度有关^[5]。测定信号可能与 b/f 值成正比或成反比,这取决于所用系统的化学性质。有两种方法用于检测存在的抗原:一是使用限量的反应试剂(竞争性分析);二是使用过量的试剂(非竞争性分析)。

竞争性分析使用限量的抗体,不足以与全部抗原结合,抗原与固定量的标记抗原竞争有限的抗体结合位点。通过结合型(或游离型)标记抗原的比例,可以测定未标记抗原的浓度。

非竞争性分析使用过量的抗体。已经建立了不同的方法以测定结合型抗原,其中应用最为普遍的是将过量抗体结合在固相载体上。结合的抗原再采用以一种便于检测(如放射性、荧光等)的方式标记的第二种抗体来测定。样品中抗原的量与固相载体上捕获的标记抗体的量成正比。

两种方法均需要将结合型标记物与游离型标记物区分开来,这可以通过两种方法实现,即异相分析法或均相分析法。异相分析法通过除去抗体的途径将结合型标记物与游离型标记物分离开;均相分析则是比较结合型抗原和游离型抗原的标记信号。

放射性标记免疫分析

最早的^[1]免疫分析法使用放射性标记抗原或抗体,这种分析方法叫做放射性标记的免疫测定。抗体结合位点具有严格的专属性,保持该专属性最好的方法是用放射性同位素取代示踪分子中的非放射性同位素(如用 ^3H 取代 ^1H)。但是,当取代发生在分子中远离抗体结合位点的部位时,放射性同位素的选择可能受到其他因素的控制,如半衰期、可获得性、高活性以及放射化学纯度等。

最常用的放射性标记物是 ^{125}I ,通过多种技术(包括氯胺 T、非水溶性碘化试剂和乳酸过氧化物酶等的碘化处理)与抗体和抗原结合。用 ^{125}I 进行碘化处理是首选的放射性标记技术,因为该同位素是 γ 射线源,价廉,且易于检测,对于大多数分析具有合适的半衰期,并且能以较高的反应特异性制备来获得。放射性碘化过程中偶尔存在的问题是免疫活性的丧失,其原因出自标记位点,或由于高能量衰变所导致的试剂化学性质的转变^[6]。使用 β 射线同位素(如 ^{14}C 和 ^3H)可解决上述问题,但需要更为复杂的用于标记测定的闪烁计数装置。

1. 使用标记抗原的放射性免疫分析法

使用标记抗原的放射性免疫分析法包括标记性抗原和



未标记性抗原（被测物）对有限量抗体结合位点的竞争，反应过程如下所示：



式中： Ag^* 为标记的试剂抗原； Ag 为待测抗原； Ab 为与 Ag 对抗的抗体。

Ag^* 和 Ab 是具有固定浓度的分析试剂，因此当加入含有 Ag 的样品时，即存在 Ag^* 和 Ag 对 Ab 结合位点的竞争。 Ag 浓度的增加导致 Ag^* 结合度的降低，通过对结合或游离型成分放射性的测定，可以检测样品中 Ag 的量。

在放射免疫分析过程中，对结合型和游离型 Ag^* 分布情况的测定需要一个分离步骤，要将 Ag^* 与 $\text{Ag}^* - \text{Ab}$ 分离开来。一旦被分离，对一个部分或两者标记物放射性的测定结果表明，信号强度大约与未标记抗原的浓度呈指数关系。图形斜率的正、负取决于被测物部分是抗体结合型还是游离型，但是校正曲线的确切形状取决于抗体结合的平衡常数^[7]。

已有许多方法用于分离结合型和游离型 Ag^* ，其中包括沉淀法、固相附着法、毛细管电泳法、色谱法、微孔过滤法等。最初，沉淀法和固相萃取法是最常用的分离技术，但是，毛细管电泳法和流动注射分析（色谱法）更易实现自动化，故这两种技术更为令人关注。

1.1 沉淀法

沉淀技术通常可以划分为两大类：非特异性和特异性。非特异性分离过程如下：通过加入盐或溶剂，降低抗原-抗体复合物的溶解度，但在该条件下，游离型标记抗原的溶解性不受影响，加入后，免疫复合物以离心的方式被沉淀，从而可以测定上清液或沉淀物的放射性。免疫测定中常用的沉淀试剂包括乙醇、硫酸铵、聚乙二醇和二氧六环等。必须注意防止未结合型标记物发生共沉淀。

特异性沉淀技术在设计上已经解决了非特异性技术存在的一些问题。在该法中，过量加入对被测抗体具有特异性的第二种抗体，从而导致最初形成的抗原-抗体结合物形成沉淀物，反应如下：

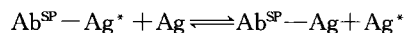


该法被称为双抗体技术，能被广泛用于多种物质的测定^[8]。双抗体技术通常比较耗时，因为第二种抗体反应可能需要数天时间才能达到平衡。沉淀速度明显取决于第二种抗体的浓度，多以聚乙二醇作为助溶剂，来提高沉淀反应速率。

1.2 固相萃取技术

早期的许多免疫分析方法使用固相萃取技术，利用二者不同的吸附性质，将标记抗原与复合物分离开来。所用的固相载体包括右旋糖酐包衣炭、离子交换树脂和纤维素粉等。标记抗原一旦被吸附，结合型标记抗原可倾析下来，从而能够分别测定结合型和（或）游离型标记抗原的放射性活性。由于非特异性吸附存在的问题以及标记抗原从固相载体上脱落所引起的误差，这些分离模式已被广泛取代，

现在所用的固相萃取中，试剂多以共价键与固相载体结合，例如，一个附着特异性抗体（ Ab^{SP} ）的固相与标记和未标记抗原发生竞争性结合的过程如下：



与抗体结合的固相载体可以粒子形式（如纤维素、琼脂糖或右旋糖酐等）悬浮在溶液中，也可能附着在试管或微量滴定器的表面。固定的固相法省略了离心的步骤，而这一步对于悬浮的小球是必要的，尽管塑料固定相的蛋白结合容量有限。

1.3 毛细管电泳

经验证，该项技术是分离大分子（如抗体等）的强有力的分离技术，其原因有两点：其一是近乎平塞形的流动曲线；其二是较小的抗体扩散常数。这些特性消除了谱带的展宽。因具有较强的分离能力和较高的检测灵敏度，毛细管电泳（CE）可用于从结合型抗原、抗体中快速分离游离型抗原、抗体，适用于免疫分析法。CE 将免疫识别和在线定量、痕量分析以及仪器自动化等特点相结合，使免疫分析具有独特的优点。在免疫分析中，CE 可以结合已有的各种 CE 检测器，从紫外、激光诱导荧光（LIF）到质谱法（MS）。CE-LIF 串联法已用于测定包括治疗药物、肽以及抗体等在内的多种化合物^[9]。

1.4 流动注射分析

该技术将样品引入流动的试剂中，在反应器中传输的过程中发生反应，然后产物在下游的检测器中测量。将免疫分析与流动注射分析（FIA）相结合，则不再需要异相反应中冗长的孵化时间，因为 FIA 利用的是非平衡条件，洗脱步骤通过缓冲液连续流动自动进行。除无须孵化期外，FIA 法较常规免疫分析的优点还在于反应器可多次使用，因为可以用合适的溶剂（如甘氨酸、HCl 等）进行再生。连续的注射可用于向免疫反应器中传输试剂、底物（如果必要）和再生试剂。开发了许多不同的分析方法，采用电化学、荧光和电发光检测等。

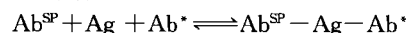
2. 标记抗体放射性免疫分析（免疫放射分析法）

蛋白质与固定相结合的难题可以通过运用固相抗原（ Ag^{SP} ）和标记抗体（ Ab^* ）予以回避，反应如下所示：



其中，未标记抗原（被测物）与固相抗原竞争抗体结合位点。该法的难点在于需要使用纯化的免疫特异性抗体。因为单克隆抗体是一种免疫特异性纯种属，故适用于标记抗体技术。

使用标记抗体的另一个方法是所谓的“三明治^[10]免疫分析法”，在该法中，被测抗原与附着在固定相上的抗体和标记抗体同时结合，反应如下：



反应是非竞争性的，因此，未标记抗原的浓度与复合



物中标记物浓度直接相关。“三明治”免疫分析法具有灵敏、便利的优点，但其局限性在于要求被测物必须是二价物，例如，要求抗原至少具有两个抗体结合位点。此外，“三明治”技术还要求抗体经过高度纯化。

酶联免疫分析法

早期的试验将酶与抗原或抗体结合，一同作为免疫分析中的试剂。可用多种方法测定酶活性，每种方法各具优点，这使许多酶成为很好的标记物质。多数分析方法建立在经酶转化所得生成物的分光特性，这些分析方法有比色法、荧光法、发光法和电量法等。

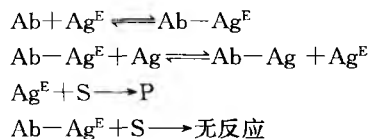
酶联免疫分析法源于 1972 年，由 Engrall 和 Perlman^[11]以及 Van Weeman 和 Schuurs^[12]开创，转化为多种以酶为基础的系统，应用于科研和常规分析领域，具有与放射免疫分析接近的灵敏度。酶联免疫分析法 (EIA) 可分为两大类：均相和异相反应。

1. 均相酶联免疫分析法

均相免疫分析 (HOIA) 无须将游离型抗原和抗体结合型抗原进行物理分离，因为抗体结合物、标记物质的物理信号可能与未结合物存在显著差异。抗体与抗原结合后，酶活性可能提高或被抑制。HOIA 操作简便，易于实现自动化^[13]。取消分离步骤避免了分析的不精确性，但由于不能除去干扰物质，分析的选择性可能受到影响。

1.1 使用酶标记抗原的 HOIA 法

Rubenstein 等^[14]介绍了一种以溶菌酶为标记酶测定吗啡的 HOIA 法。以共价键形成的酶标记抗原 (Ag^E) 与样品中的抗原 (Ag) 竞争有限浓度的抗体结合形成复合物。由于与抗体结合所导致的空间位阻^[14]或变构抑制效应^[15]，生成的复合物几乎不显示酶活性。由于存在 Ag ，竞争性结合 Ab ，使更多的 Ag^E 不被结合，以游离形式催化底物转化为产物。因此，酶活性可通过产物 P 的出现和底物 S 的消失来测定，与样品中游离抗原的量成正比^[16]。

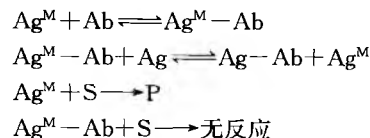


基于这一原理的 HOIA 法已用于许多诊断试剂和内源性化合物的测定，该法使用 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G-6PDH)，命名为 EMIT^R (酶介导的免疫试验)。通过测定由 NAD 产生的 NADPH 的吸收光谱 (在 340nm 处有较强的吸收)，可很方便地测定酶活性，该法快速、灵敏，可检测到皮摩尔水平^[17]。

1.2 使用酶调节剂标记抗原的 HOIA 法

该法基于使用酶调节剂 (用于调节指示酶的活性) 标记稳定的抗原 (Ag^M)。 Ag^M 与游离抗原 (Ag) 竞争有限

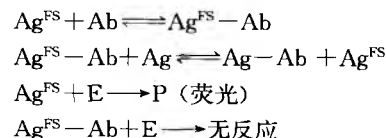
的抗体 (Ab)。 Ag^M 与 Ab 结合后，就不能用于调节指示酶的活性。当被测物浓度增大时，便可以顺利地竞争抗体上的结合位点，使更多的 Ag^M 游离，从而与指示酶结合，并调节其活性^[18,19]。正相调节剂会增加酶活性，反之，负相调节剂则会降低酶活性。因此，在正相调节剂存在的情况下，酶活性与被测物浓度成正比，在负相调节剂存在的情况下，酶活性与被测物浓度成反比。



基于上述原理，建立了测定人血清中甲状腺素^[20]和茶碱^[21]的实际分析方法，并考察了不同种类的调节剂。

1.3 使用荧光酶底物标记抗原的 HOIA 法

该法最初由 Burd 等^[22]建立。抗原与荧光酶底物 (Ag^{FS}) 结合，形成稳定的共轭体，与样品中的抗原 (Ag) 竞争有限浓度的抗体 (Ab)。与抗原结合的底物是酶的荧光底物，且仅在不与抗体结合时才具有反应活性。因此，当样品中具有高浓度游离抗原 (Ag) 时，更多的 Ag^{FS} 可以游离出来作为酶的底物，并形成更多的产物。因此，随着样品中 Ag 浓度的增加，荧光强度增加。

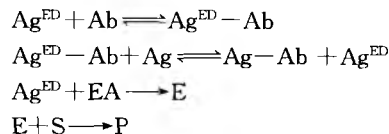


在该系统中，伞形烷- β -半乳糖酐作为 *E. Coli* β -半乳糖酐酶的荧光底物^[23]，该法还开发了固相试剂条^[24]。

1.4 使用克隆酶供体的 HOIA 法 (CEDIA^R)

该项技术使用两种不同的非活性酶片段，即称作酶受体 (EA) 的大片段和称作酶供体 (ED) 的小片段^[25]，这些片段可以结合起来形成活性酶。

在该项技术中，将抗原用酶供体进行标记后，具有与酶受体 (AD) 反应成为酶活性。当标记抗原与抗体 (Ab) 结合时，酶活性丧失， Ag^{ED} 结合物和供试剂中的 Ag 竞争以形成抗体结合物。样品中抗原浓度增加可置换 Ag^{ED} ，使更多的游离 Ag^{ED} 可以与 EA 结合，导致更大的酶活性来形成底物 (P)。酶活性与样品中游离抗原的量成正比。



CEDIA 用于测定重要的相关诊断药物，多数具有皮摩尔级检测限。

2. 异相酶联免疫分析法

异相酶联免疫分析法至少需要一步分离过程，将结合型和游离型物质分离开来。酶联免疫吸附试验 (ELISA)

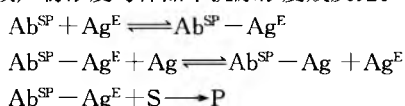


是一种广泛应用的异相免疫分析法。在该法中,抗原或抗体固定到固相上。与 HOIA 法的实质性区别在于:在 HEIA 法中,将酶标记物设计为即使与抗体发生反应后仍可以保持活性。与 RIA 法相比,不使用同位素标记的 HEIA (如酶标记测定法)具有许多重要的优点,其中包括更长的储藏寿命、较少的健康危害和简单的设备配置等。HEIA 法可以分为竞争性和非竞争性测定。

2.1 竞争性测定法

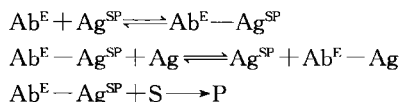
酶标记抗原结合物:在该方法中,酶标记抗原 (Ag^E) 与样品抗原竞争吸附在固相载体 (如聚苯乙烯) 上的有限量抗体 (Ab^{SP})。经过孵育后,未结合型 Ag^E 经过表面活性溶液洗涤被除去,固相载体上的抗体含有结合有标记抗原和未标记抗原,与底物 (S) 一同进行孵化,产物浓度通过比色法或荧光测定法进行测定。

酶活性或产物浓度与样品中抗原浓度成反比。



该法对于测定低相对分子质量被测物如类固醇、褪黑素或药物如可卡因^[26]非常重要,灵敏度可达 1 fmol 以下。

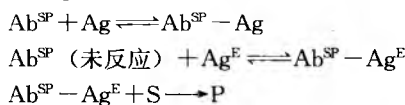
酶标记抗体:该法使用标记的抗体 (Ab^E) 和吸附在固相载体上的抗原 (Ag^{SP})。待测抗原 Ag 的加入减少了 Ag^{SP} 和 Ab^E 的结合。



酶活性与待测抗原 Ag 浓度成反比。运用该法在不到 1.5h 可以定量测定皮摩级的人 IgG^[27]。利用该法还定量测定了法摩级的雌酮-3-葡萄糖苷酸。

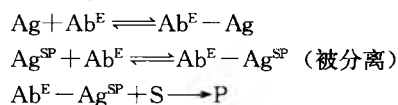
2.2 非竞争性测定法

酶标记抗原:在该法中,待测物先与稍过量的结合在固相载体上的抗体 (Ab^{SP}) 进行孵化,洗涤以后,用过量的酶标记抗原 (Ag^E) 与未反应的 Ab^{SP} 结合。



底物 (P) 的浓度与标准抗原或待测抗原浓度成反比。

酶标记抗体:待测抗原 (Ag) 与稍过量的酶标记抗体 (Ab^E) 进行孵化,混合物加至稍过量的结合在固相载体上的抗原 (Ag^{SP}) 上,分离未反应的 Ab^E 。



酶活性与待测物浓度成反比,该反应已用于测定 α -胎蛋白^[28]。

夹心或双抗体法:该法用于具有多个抗体结合位点 (抗原决定簇) 的抗原。过量的固定未标记抗体 (Ab^{SP}) 与

待测物或抗原进行孵化。洗涤后,抗体-抗原复合物与过量的酶标记抗体进行孵化,该抗体与一个或多个抗原位点结合,形成夹心型复合物。



在该反应中,酶化产物的浓度与待测抗原的浓度成正比。

夹心法适用于定量测定具有多个抗原决定簇的抗原,如抗体、类风湿因子、多肽、激素、蛋白质和乙型肝炎病毒表面抗原等。用夹心型免疫分析法得到的结果与具有精确、方便、灵敏的放射性标记法得到的数据具有可比性。建立了高灵敏度的甲状腺刺激激素测定法以及在阿摩 (10^{-18} mol) 级测定雌激素和雌二醇的方法^[29]。

3. 卵白素-生物素系统

每一个完整的酶联测定法必须具备酶标记的抗体或抗原结合物。在本章第一部分讨论了形成这些结合物的方法。已被广泛应用的另一种方法是建立在卵白素-生物素反应的基础上。卵白素是一种从蛋白中发现的相对分子质量大约为 60 000 的蛋白质,它由四个相同的亚单位构成,每个亚单位均可以极高的亲和力与生物素结合。据报道,相对于其 160 天的解离半衰期可得出其解离常数为 10^{-15} , 因此,从应用角度考虑,这样的结合在自然界中可认为是不可逆的。

在免疫化学分析中应用生物素-卵白素系统的原理在于卵白素可以结合生物素类取代物。多肽和蛋白质很容易利用活化的生物素-N-羧基琥珀酰亚胺通过其氨基与生物素发生酰化作用。

用于蛋白质和多肽等发生生物素酰化作用的试剂可通过商业购买途径获得,能够使抗体、酶等快速、高效地发生衍生化作用,同时又不会降低其酶和抗体的活性。一些试剂还可用于巯基醛类、核酸和碳水化合物等的生物素酰化反应。因此,除了蛋白质和多肽等,许多抗原可用生物素进行标记。

卵白素可以通过共价结合技术或所谓的卵白素-生物素络合 (ABC) 作用与酶结合。在后一种情况下,卵白素和多聚生物素酰化酶结合形成复合物,卵白素和多聚生物素酰化酶比例的选择依据是,所形成的复合物结合了许多酶分子,但需留有生物素结合位点,从而与生物素酰化的抗体或抗原发生反应。为许多不同的酶选择 ABC 复合物的过程已实现商业化。当生物素酰化抗体/抗原和许多酶标记卵白素衍生物或复合物易于制备后,促进了酶联免疫分析的灵活设计。

最常用的实验模式是使用一个预先吸附在固相载体 (如微孔板表面) 上的初级抗体。第一步,加入抗原 (被测物),当抗原与固着的抗体结合以后,洗涤反应器,再加入经生物素酰化后的第二种抗体,由固化抗体、抗原和生物素酰化抗体形成的夹心物与 ABC 复合物进行孵化。经过洗涤后,抗体-抗原-生物素酰化抗体-ABC 复合物系统通过加入酶底物进行检测。该法通过非竞争性与 ABC 复合物 (它

可以将信号放至甚大)结合,其灵敏度(在法摩水平)经常超过放射免疫分析法。

同时还介绍了基于卵白素-生物素系统的竞争免疫分析法。在该试验中,抗体被固定在微滴定板上,将恒定浓度的生物素酰化试剂与不同浓度的标准品或待测物置于多孔板中进行孵化。经过洗涤后,加入ABC复合物,所形成的抗体-生物素酰化抗原-ABC夹心物通过加入酶底物进行检测。固化酶的活性与样品中待测物的浓度成反比,得出一条典型的S形校正曲线。

荧光免疫分析

荧光免疫分析(FIA)是测定免疫化学结合体系中抗体或抗原的荧光强度,其光谱特征随被测物浓度而变。因为自然界存在的抗原和抗体很少具有荧光特性,故通常采用荧光标记的方式。荧光标记物用于均相和异相免疫系统中,可以竞争标记/未标记型抗原、抗体或固定载体进行结合,或作为酶底物存在于溶液中。

在荧光免疫分析中,通过共价结合来标记抗原或抗体的荧光分子称作荧光探针或标记物。荧光探针是小分子物质,与蛋白质或其他大分子发生反应后,其荧光特性改变。

在使用荧光标记的定量免疫分析中,荧光染料应当具备以下几个化学和分光性质:标记的配体应具有较高的水溶性,因为免疫分析通常在水溶液中进行,在此条件下抗体稳定。荧光发色体上的特定官能团有利于其与配体的结合。包含酰基氯、异硫氰酸根离子和重氮基等基团的荧光发色体衍生物可用于将标记物与配体结合。用荧光探针标记配体时需要注意的一个重要方面是可能改变配体对其抗体的特异性,因此,结合位点的选择原则是能够最大面积暴露出可供抗体识别的官能团。除此之外,稳定性和储藏周期也是需要考虑的重要因素。

选择荧光发色体时最重要的光谱性质是所选激发波长处的摩尔吸光系数、标记物荧光所产生的量子、吸收和发射谱带以及Stokes频移。理想状态下,荧光标记物应当在电磁波谱的可见光区具有较高的摩尔吸收,从而远离生物体液中蛋白质和其他内源性干扰物的激发光谱。此外,发射波长也应当落在可见光区,Stokes频移至少等于(以荧光最大值至最大波长的吸收极大值表示)50nm。同时希望抗体结合物或游离标记配体所产生的为高量子数荧光。

最常用的荧光素为异硫氰酸荧光素(FITC)和许多活性的罗丹明染料。异硫氰酸荧光素可以产生较高的量子数,能够在比较温和的条件下与药物或其他配体结合^[30,31]。

用荧光金属螯合物标记配体已经产生了许多种荧光探针。稀土金属螯合物具有独特的发射光特点,由于镧系复合物配体的芳香基团的激发作用,激发能被有效传输给镧系金属离子,导致f-f能级跃迁,产生线状的狭窄谱带,使得所有发射光可被很窄的狭缝检测器收集。此外,稀土螯合物在产生较大的Stokes频移时可产生大的量子数。这些螯合物的激发光区域很广,镧系金属发光的状况通过利用

相对较宽的激发光谱带和较窄的发射光谱带,因此具有较好的灵敏度和选择性。将稀土螯合物与荧光技术合适的结合,建立了灵敏的免疫分析方法,避免了常规免疫分析中存在的大量干扰因素。

1. 均相荧光免疫分析

由于所产生光量子的灵敏度以及荧光发色团微环境下的荧光光谱的位置,荧光免疫法常可以很好地应用于均相技术中。荧光免疫法无须将结合型与游离型的配体分离开来(这是该法最主要的优点),能够进行简单、快速、可靠的定量分析。游离型和抗体结合型配体所需的微环境不同。在水溶液中,游离抗原与水分子相互作用,产生较强的偏振力。由于电子态有不同的偶极矩,这种偏振力在标记抗原的基态和激发态有着不同的强度。同时,在水中发生荧光能级跃迁前后,荧光发色团上的特定官能团可以自由旋转。在抗体结合位点的疏水环境下,介电强度低,荧光团上官能团的旋转受到强烈抑制。抗体结合型标记抗原的溶剂化作用和旋转抑制作用导致其所产生荧光波长较游离标记抗原更短,这是因为,受到静电和电子相互作用的强烈影响,后者激发态的相对稳定性比结合型标记抗原更好。然而,抗体结合型探针的弱的溶剂化作用和受抑的旋转自由度,使得结合型探针发出的荧光比游离型探针更强,因为结合型探针在一定程度上受到内部转化作用的屏蔽,而这种屏蔽作用可以削弱激发态的荧光淬灭作用。

如果结合型标记配体的荧光发射光谱被充分替换,光强度较游离型标记配体有所提高或降低淬灭,则产生的光度测量可用作定量,且无须进行分离。另外,以前酶联免疫分析如反应物标记免疫分析中所述的技术,可以作为荧光免疫分析法的基础。例如,基于在酶反应中生成或消耗光学特性的荧光发色团进行定量。

荧光免疫分析不要求游离型和结合型标记物体有不同的荧光光谱,在此基础上发生了两个相当有趣的变化,在临床分析中十分流行。这就是荧光偏振免疫分析和时间分辨荧光免疫分析。

1.1 荧光偏振免疫分析

荧光偏振免疫分析(FPIA)法的物理学原理涉及选择性消除那些电矢量不在单一平面的光波。该过程通过将激发光经过一个偏振过滤器来完成。所产生的偏振射线会选择性激活那些在发生吸收跃迁短时与发射光束电矢量平面有同样成分的分^[32]。因此,由偏振光激活的分子会发出辐射,其偏振方向与激发光一致,在一定程度上与光吸收和发射期间所产生的布朗旋转的程度成反比^[33]。这意味着由偏振光所激发的具有很小体积的光选择性分子(如游离的标记抗原)对应于激发光的偏振平面有随机取向,因为它们的旋转快于发射荧光的旋转。因此它们很少显示偏振荧光。但是光选择性分子具有像抗体蛋白及其复合物那样很大的体积,会以与其发射的荧光比较相当或稍慢的速度旋转。因此,这些大分子不可能存在荧光跃迁矩的随机性,



可观察到大的荧光偏振现象。

当抗原与抗体结合后, 荧光标记物的旋转布朗运动减慢或受到抑制。这将导致沿着或垂直于激发偏振器光轴方向的荧光发生明显偏振, 该方向取决于分子的荧光跃迁矩和激发的吸收谱带相关的跃迁矩之间呈近于 0° 还是 90° 。我们先来研究激发光与荧光跃迁矩平行 (或近乎平行) 的情况。

如果在荧光性样品和荧光检测器之间安装另一张偏振膜 (发射偏振器), 且其光学轴垂直于灯和样品之间的偏振膜, 那么来自抗体标记性配体的高偏振性荧光较相同条件下激发的相同浓度的游离型标记配体的非偏振性荧光滤过量大。如果两个偏振器光轴平行, 且荧光团的激发和发射力矩平行或近乎平行, 则发射偏振器从结合型标记配体传递到检测器的射线较从游离型标记配体传递的射线多, 因为非偏振性发射到发射偏振器光轴 (的光) 会向各个角度分散, 其中会有一部分被滤过。如果不考虑另一个偏振器光轴相对于第一个的取向, 理论上讲, 检测器记录的荧光强度应当与非偏振性荧光 (如游离型标记配体的荧光) 强度相等, 但是, 在吸收 (光) 与荧光跃迁矩平行 ($F_{//}$) 的情况下, 当偏振器光轴平行时, 从结合型标记配体测得的偏振性荧光强度应当大于与荧光跃迁矩垂直时 (F_{\perp}) 的情况; 在吸收 (光) 与荧光传输力矩垂直 (F_{\perp}) 的情况下, 对于游离的标记配体, $F_{//} = F_{\perp}$ (非偏振性荧光), 而对于结合型标记配体, $F_{//} > F_{\perp}$ (偏振性荧光)。我们将偏振程度定义如下:

$$P = (F_{//} - F_{\perp}) / (F_{//} + F_{\perp}) \quad (1)$$

对于游离的标记配体, $F_{//} = F_{\perp}$, 故在所有激发波长下均有 $P = 0$; 对于结合型标记配体, 可能存在 $+1/2 > P > -1/3$, 这取决于激发波长。但是, 如果系统设计成最初包含所有抗体结合物、标记配体, 加入未标记配体, 标记药物将被取代。溶液中非偏振性荧光的相对增加和偏振性荧光的相对减少会导致按照方程^[1]计算所得的 P 值的净减少。如果所有的标记配体最终均被抗体结合物取代, P 值会降为 0。根据与标记配体的结合程度, 偏振度在非零和零之间变动。由此可以以荧光偏振度对未标记配体浓度绘制标准曲线, 这就可以进行均相免疫分析。

采用偏振荧光对许多抗原-抗体反应进行定量测定的方法得到广泛应用。两个特殊的例子是血清中庆大霉素和二苯基乙内酰脲钠^[30,34,35]的测定。运用荧光偏振法测定常规药物水平的方法受到以下因素的制约: 偏振膜上光能量损失以及因背景干扰所造成的灵敏度降低。

1.2 时间分辨荧光免疫分析法

迄今几乎所有的荧光测定技术都基于在“稳态”条件下测定所产生的荧光的强度。“稳态”荧光测定源于使用持续暂时输出的激发射线照射激发样品。在常规荧光测定法中所用的灯和能量的来源是持续的发射光源。样品经过短时间的初始激化达到稳定状态, 此时被测物的激发率等于使最低激发态单线态 (荧光、内部转化和系统间交叉) 所

有过程的失活率之和。当达稳态时, 荧光强度不再随时间改变, 产生可用光检测器测定暂时恒定的信号。但是, 随着现代化电光 (技术) 的发展, 已经能够采用闪光灯脉冲的闸流管激发具有潜在荧光性的样品, 闪光灯在 $2 \sim 10\text{ns}$ 内发射出射线, 脉冲间隔大约为 0.2ms ; 或采用脉冲激光作为光源, 其脉冲间隔为几个皮秒。用这种脉冲光源激发的荧光样品不会持续具有荧光, 而且, 如果是用单一脉冲光源激发的话, 荧光强度会以指数形式衰减, 直至下一个脉冲对样品再次激发。脉冲光源所发挥的作用像磷光法中机械断续器的作用。经检测后, 由脉冲光源激发样品所产生的荧光可表示为时间的函数, 通过快速采样示波器或多通道连接脉冲分析器的 $x-y$ 曲线绘制器测得。前一种方法称作脉冲光源荧光测定法, 后一种方法称作时间相关单一光子计数法。对于任何一种情况, 衰减时间长于脉冲光源特征参数的荧光可以采用与放射性衰变曲线相同的分析方法处理。采用半对数曲线法以荧光强度对时间作图, 得到一条直线 (或者一系列相交直线, 如果是多个荧光物作比较, 但具有不相等的衰减时间), 其斜率与衰减时间成正比, 其垂直截距可以同定量测定用荧光标准溶液相比较。但是, 如果灯的脉冲时间和荧光的衰减时间类似, 那么必须从所得到的信号中扣除灯的特征信号, 从而得到荧光团的衰减特征。通常需要用计算机将光源和荧光团混合的时间特征进行去卷积积分处理。

脉冲光源 (时间分辨) 法是利用各种荧光物质衰减时间的差异进行光谱分离, 而不是根据其荧光强度。这说明许多荧光交叠的物质, 如游离型和抗体结合型配体可以同时定量分析。镧系元素螯合物标记的抗体具有较长的寿命 (在毫秒至微秒之间), 它是时间分辨荧光免疫分析法的基本方法, 由此商品化的仪器已问世。

2. 异相分析

到此为止, 荧光免疫分析法的多数研究和发展集中在均相分析领域, 遗憾的是, 均相分析并不是总能够提供最佳的灵敏度。原因可能是内源性蛋白物质的背景荧光、由蛋白质产生的 Rayleigh 和 Raman 散射或由于荧光标记物的发射引起环境灵敏度的缺乏。尽管均相分析过程具有快速、简便等优点, 有时仍需要在进行荧光法定量测定前将抗体-配体复合物与样品中其他物质进行物理分离, 以避免上述问题。

可以通过各种方法将抗体结合型配体与游离配体及溶液中其他荧光物质分离开, 这些方法基于游离配体与抗体-配体复合物之间的化学、物理和免疫学差异, 以及凝胶渗透色谱法、使用无机盐或有机溶剂的化学沉淀法、双抗体法以及使用固相载体将抗体吸附或共价结合等。对于后一种方法, 固相材料可能是纸片、试管壁、玻璃或塑料珠、交联葡聚糖或琼脂糖。抗体一旦固定在固相载体上, 标记和未标记配体被引入, 竞争抗体上的结合位点, 通过洗脱, 结合型标记部分与游离型标记配体分离开来。与抗体结合的标记配体可以通过荧光仪^[36]的前表面荧光检测器附件直

M

接测定, 无须从固相载体上转移下来。

化学发光免疫分析法

在所有的放能反应中, 能量被释放出来, 这些能量通常以热能的形式释放出来, 但在一些反应中, 该能量以光的形式释放, 即化学发光现象。在化学发光反应中, 可形成一个或多个生成产物, 处在电子激发状态。在荧光过程中光从受激发的分子中发出。化学发光反应几乎无一例外都是氧化还原反应。许多具有较强化学光, 适用于分析检测系统的化合物或在化学发光反应中作为催化剂或试剂的化合物已被研究并用于化学发光免疫分析中, 这些化合物中有合成有机化合物 (如酞嗪二酮类: 吖啶酯类)、生物光反应中的辅因子 (NAD 和 ATP) 和酶 (过氧化物酶、氧化酶、激酶和荧光素酶)。

与抗原或抗体的共价结合通过标记物 (如与异硫氰酸盐进行重氮化作用或反应) 的化学修饰、抗原或抗体 (如与半琥珀酸酯、戊二醛反应) 的化学修饰, 或与双官能试剂 (混合的碳化二亚胺酐、双 *N*-羟基琥珀酰亚胺和叠氮基琥珀酰亚胺) 结合来实现。

其中最强的化学发光性物质是发光氨 (5-氨基-2, 3-二羟基酞嗪-1, 4-二酮)。如果氨基连接在苯环的 6-位, 分子称作异发光氨。通过烷基空间基团, 异发光氨很易与抗体或抗原结合。经验证, 氨基叔丁基乙基异发光氨 (ABEI) 是有效的化学发光性标记基团, 因为与低或高相对分子质量化合物结合后其活性通常不变, 通过混合酞化反应^[37], 很易与免疫相关性物质活化的羧基结合。通过将蛋白质 (如抗体) 的游离氨基与 ABEI——异硫氰酸酯衍生物反应^[38], 可用 ABEI 将蛋白质充分进行标记。

发光氨和异发光氨衍生物在高 pH 条件下通过电子激发态生成 2-氨基邻苯二甲酸酯或 4-氨基邻苯二甲酸酯以及氮。从激发态到基态的转化导致最大波长为 425nm 的光的发射。其定量可能达到皮摩甚至阿摩水平。

在疏质子溶剂中, 氧化反应仅需要氧和碱; 在质子化溶剂中, 还需要有催化剂, 在催化剂中, 经常使用酶 (如山葵过氧化物酶)。

吖啶酯也用于免疫测定过程中, 具有无须催化剂参与发光反应的优点。氧化反应前调节溶液 pH 至 6~7, 加入氧化剂过氧化物以保证最高反应活性。

1. 直接化学发光免疫分析法

通过将化学发光化合物与抗原或抗体偶联, 并且认为偶联产物的免疫学和化学发光性质均未发生明显变化, 上述反应可用于免疫分析。将化学发光分子与所需配体相结合的方法明显取决于这两种物质的性质。如果这两种物质均是小分子, 那可用传统的合成有机化学法。但如果其中一种或两种物质均为复杂大分子 (如蛋白质), 问题就出现了。应为这些分子的官能度是由化学或物理环境决定的, 可用的化学法范围受到限制。作为直接化学发光免疫分析

法的一个例证, 可将抗体固定在固相载体上, 抗原可与之结合。经过洗涤之后, 加入能够识别不同抗原决定簇的第二种化学发光性标记抗体。经过进一步洗涤, 化学发光性标记物被激活, 发射的光用于定量。因为该测定方法建立在夹心理论的基础上, 增加被测物的量会增加光的发射。

通过化学发光性抗原可以很容易地设计出使用竞争性免疫技术的化学发光测定法。在该情况下, 化学发光性抗原与样品竞争固定的抗体, 依靠反应抗原的性质, 结合型和未结合型标记物也可以通过吸附在活性炭上从而被分离。

2. 间接 (酶介导) 化学发光免疫分析法

间接化学发光免疫分析法是一种除使用与抗原或抗体偶联的原始化学发光发射体以外, 还使用另一种成分的方法。该种成分可能是一种辅助因素或是一种催化剂, 甚至可能是一种可以将非化学发光性前体转化为化学发光性或潜在化学发光性物质的分子。多数间接分析法是由酶介导的。

一种广泛使用的由酶介导的化学发光免疫分析法^[39], 使用由萤火虫产生的荧光素酶, 在 ATP 存在的情况下催化 D-荧光素的氧化反应。D-荧光素, 而不是荧光素酯, 如磷酸酯, 在酶存在的条件下发生氧化反应。通过抗原-抗体反应, 抗原或抗体-酶结合物被结合在固相载体上, 固化的酶通过酶的催化作用释放出 D-荧光素, 之后 D-荧光素通过建立在荧光素基础上的发光反应进行定量分析, 这里介绍碱性磷酸酯酶的测定。

将萤火虫的荧光素加入以过氧化氢为氧化剂、以辣根过氧化物酶为催化剂的反应混合物中^[40], 鲁米诺衍生物的化学发光信号会加强, 这导致了发光时间的延长。苯并噻唑 (如脱氢荧光素和 6-羟基苯并噻唑衍生物) 也可以将发射光增强 500~1000 倍, 显示出较鲁米诺更长时间的更为恒定的发射光。对于这些衍生物可以观察到 15 分钟以上的较为恒定的发射光^[41]。恒定延长的发光模式将分析过程简化为可以在发光测定计外部启动多步反应, 无须将化学发光反应放在光电倍增器的前端启动。

另一个化学发光酶系统建立在使用稳定化的二氧烷底物的基础上, 二氧烷在许多化学发光反应中充当中间体, 合成稳定的二氧烷 (磷酸酶和 β -半乳糖酶部分) 是可能的, 它不会自发进行反应, 如果与合适的酶 (碱性磷酸酯酶和半乳糖酶) 接触, 它会失去稳定性, 自发进行化学发光反应^[42]。

电化学免疫分析法

电化学免疫分析法包括一系列广泛的设施, 建立在将免疫反应与电化学转换相偶联的基础上, 其全部内容就是将一种免疫反应组分固定在电极转换器的表面。电化学检测基于待测物或一些报告分子的直接内在氧化还原作用。检测通过测定简单的电流或电压电荷, 无须昂贵的仪器。可使用多种不同的检测方法, 但最广泛使用的方法是安培

法,在不同的测定中还用到电势法和电导法。

检测需要不同的电极和多种固定化步骤。经常使用的是金电极、筛膜电极和炭材料(如石墨和玻炭)电极。传感相通过对特定的免疫试剂进行共价结合、物理吸附或膜捕获的方式置于电极表面。

电化学免疫分析法的主要优点是该法建立在非光学检测的基础上,从而可能在全血存在的条件下检测信号。使用电化学检测系统有三种不同的方式。

1. 直接监测抗原-抗体反应

到目前为止,这是电化学免疫法中最简单的方法,因为该法无须标记。通过分析简单溶液,可以有许多方法,但是当传感器暴露的生物基质中时,进行检测需要相当多的工作。

2. 使用电活性化合物作为标记物

作为免疫分析标记物,具有电活性的化合物必须具有合适的电化学性质。它必须能够溶于水溶液中,在具有较宽 pH 范围的溶液中应稳定。为了能够检测,它可以进行高选择性电化学检测,或者具有可使选择性膜用于测量电极的化学性质。

(使用)内在电活性标记物的一个优点是无须酶标记法中所用的底物、辅助因子或特殊的孵育步骤。但是其结果是失去了酶介导的信号放大(作用),从而提高了对检测灵敏度的要求。曾采用竞争性异相分析法使用钼离子测定人血浆中的白蛋白^[43]。

3. 使用测定电活性产物或底物进行监测的酶标记放大增强

对电化学标记物进行直接测定存在着灵敏度方面的问题,基于这一原因,开发电化学免疫分析法的重点集中在通过测定酶催化反应中产生的电活性产物来测定酶标记物。许多种酶标用于电化学免疫分析中,包括葡萄糖氧化酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和碱性磷酸(酯)酶^[44]。

葡萄糖氧化酶通过将氧还原为过氧化氢以催化将葡萄糖转化为葡萄糖醛酸的反应。理论上讲,监测氧的消耗量与过氧化氢的释放量均可用于检测葡萄糖氧化酶的活性。但由于氧在生物体液中具有较高的本底水平,故通常选择监测过氧化氢。其他的葡萄糖氧化酶测定法也有应用(如二茂铁和 1,4-苯醌),其中,氧被其他电子受体替代,因为该法具有更快的反应速率、更低的氧化电位且该检测系统对样品中氧的灵敏度降低。一个基于二茂铁的均相测定方法用于测定异羟基地黄毒苷元^[45]。

在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的催化作用下,葡萄糖-6-磷酸酯转化为 6-磷酸葡萄糖酸酯,同时 NAD^+ 被还原为 NADH 。但是由于电极反应所需的高的过电位和电极污染,采用直接电化学方法测定 NAD(P)H 相当困难,而使用氧化还原反应介质(如苯醌、二茂铁和吩噻嗪等)可以解决这些问题。通过使用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶已经检测了茶

碱和二苯基乙内酰脲钠。

在电化学免疫分析法中,碱性磷酸(酯)酶是最适用的一种酶,因为其具有较高的转化率和较宽的底物专属性。用过不同的底物,但 4-氨基苯基磷酸最为适用,因为反应产物 4-氨基酚易于脱氢(氧化),不易污染电极表面。使用碱性磷酸酯酶已经检测了甲状腺素-球蛋白结合物、氢化可的松和前列腺素磷酸酯等。

脂质体免疫分析法

当磷脂分子在水溶液中自发性聚集成球体,由一层或多层磷脂双分子层膜围成一个含水的腔体,即形成脂质体,该腔体可捕获多种物质。在免疫分析法中,许多可进行检测的标记物被包裹在囊状物中,所用标记物的种类范围从无机盐[如 KCl 、 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$]、广泛应用的荧光标记物(如钙黄绿素、羧基荧光素、硫代罗丹明 B 和螯合物),一直到各种酶(如碱性磷酸酯酶、辣根过氧化物酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)。具有很宽范围的检测方法和底物适用于这些酶,包在囊壳中的分子的量与抗原的量成正比。为了达到最低检测限,包在囊壳中的分子(标记物)的量应尽可能的高。荧光标记物最为常用,因为其较易测量且非常灵敏。除了最常使用的小分子荧光物质外,大分子如酶和酶的辅助因子也经常被包获。使用大分子的优点是从脂质体膜渗透量低。多数标记物是水溶性的,但脂溶性标记物(如甾衍生物)也可以结合在脂质体上^[46],这些标记物主要结合在膜上,消灭了渗漏。

脂质体-包裹的标记物复合体的量与抗原的量相关,因此脂质体必须直接或间接与抗原结合。在直接法中,脂质体与抗原结合,间接法则将抗体或另一种分子结合在脂质体上。

1. 均相脂质体免疫法

因为脂质体具有特殊的结构特征,可以利用这些特征开发合适的方案。关键在于在溶解试剂存在的情况下,脂质体能够保持其结构的完整性,而这些溶解试剂在体液中是很可能存在的。但是大多数脂质体免疫法使用天然溶解剂,最常用的两种是补体^[47]和二甲双胍^[48]。

当外界细胞进入人体后,被抗体捕获附着在细胞膜表面,补体与这些抗体按照特定的顺序结合,之后靶细胞被溶蚀。因为脂质体双分子层结构与细胞壁类似,补体可用于完全溶解抗体结合型脂质体。应当注意这样的情况:虽然补体具有特异性,一些脂质体无须与抗体结合,但对补体细胞溶解很敏感。多数脂质体免疫分析法是基于补体的均相分析法。

二甲双胍也可以完全溶蚀脂质体,尽管反应很慢,在蜜蜂毒液中可以找到,其生物学任务是进行细胞破坏。溶细胞素介导的分析方法使用二甲双胍和抗原的结合物。该结合物可以是游离型,能够溶蚀脂质体;或者与抗体相结合,无法溶蚀脂质体,因此生物活性与样品中的抗体量成



M

反比。使用二甲双胍分析方法的坏处是抗原的可用范围受到尺寸限制,因为大尺寸抗原会限制二甲双胍的活性,以二甲双胍作为溶蚀剂,采用均相脂质体免疫法可以测定生物素和异羟基洋地黄毒苷元。

已有均相免疫分析法使用补体和二甲双胍之外的溶蚀剂。磷脂酶 C 用于催化磷脂的去磷酸化反应,因而使脂质体的稳定性下降。该方法通过将抗体与抗原-磷脂酶 C^[49] 复合物相结合,来抑制溶解活性。庆大霉素即使用该法测定。

已经开发出使用鼠单克隆抗体包衣的脂质体和抗鼠单克隆抗体包衣的磁珠的分析方法。将这两种成分进行孵化,通过与磁珠结合,脂质体去稳定性,结果捕获的标记物被释放出来^[50]。

2. 异相脂质体免疫法

与均相免疫分析法相比,已建立的异相免疫分析法较少。正如所有的异相分析法,异相脂质体免疫法或脂质体免疫吸附法常采用一步或多步方法,经洗涤将特异性结合脂质体与游离脂质体分离开来。经洗涤后,使用能够有效、快速溶蚀所有脂质体的清洁剂分解脂质体(如 Triton X 100)。这些方法可认为是酶联免疫法的改进。

本章对已经存在的免疫分析法做了一个简单的概述。将来新药开发需要更为通用、灵敏的测试手段,可以确信,免疫分析法在实现这一目标方面会一直占据重要地位。

参考文献

- Berson, S. A.; Yalow, R. S. Quantitative Aspects of the Reaction Between Insulin and Insulin-Binding Antibody. *J. Clin. Invest.* 1959, 38, 1996—2016.
- Male, D.; Champion, B.; Cooke, A. Maturation of the Immune Response. *Advances Immunology*; J. B. Lippincott Co.; Philadelphia, 1987; 10. 1.
- Edelman, G. M.; Gall, W. E. Antibody Problems. *Ann. Rev. Biochem.* 1969, 38, 415—466.
- Kohler, G.; Milstein, C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* 1975, 256, 495—497.
- Campfield, L. A. Mathematical Analysis of Competitive Protein Binding Assays. *Principles of Competitive Protein Binding Assays*; Odell, W., Franchimont, P., Eds.; John Wiley & Sons: New York, 1983; 125—148.
- Izzo, J. L.; Roncone, A.; Izzo, M. J.; Bale, W. F. Relationship between Degree of Iodination of Insulin and its Biological Electrophoretic and Immunochemical Properties. *J. Biol. Chem.* 1964, 239, 3749—3754.
- Potts, J. T., Jr; Sherwood, L. M.; O'Riordan, L. L. H.; Aurbach, G. D. Radioimmunoassay of Polypeptide Hormones. *Advan. Intern. Med.* 1967, 13, 183—240.
- Midgley, A.; Hepburn, M. R. Use of Double Antibody Method to Separate Antibody Bound From Free Ligand in Radioimmunoassay. *Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques*; Langone, J. J., Ed.; Academic Press: New York, 1980; 74, 266—273.
- Bao, J. J. Capillary Electrophoretic Immunoassays. *J. Chromatogr. B.* 1997, 699, 463—480.
- Salmon, S. E.; Smith, B. A. Sandwich Solid Phase Radioimmunoassays for Characterization of Human Immunoglobulins Synthesized In-Vitro. *J. Immunol.* 1970, 104, 665—672.
- Engrall, E.; Perlman, P. Enzyme - Linkend Immunosorbent Assay (ELISA): Quantitative Assay of Immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971, 8, 871—874.
- Van Weeman, B. K.; Schuurs, A. H. W. M. Immunoassay Using Antigen-Enzyme Conjugates. *FEBS Letter* 1971, 15, 232—236.
- Brunk, S. D.; Hadjiioannou, T. P.; Hadjiioannou, S. I.; Malmstadt, H. V. Adaptation of Emit Technique for Serum Phenobarbital and Diphenylhydantoin Assays to Miniature Centrifugal Analyzer. *Clin. Chem.* 1976, 22, 905—907.
- Rubenstein, K. E.; Schneider, R. S.; Ullman, E. F. Homogeneous Enzyme Immunoassay - New Immunochemical Technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972, 47, 846—851.
- Rowley, G. L.; Rubenstein, K. E.; Huisjen, J.; Ullman, E. F. Mechanism by Which Antibodies Inhibit Hapten-Malate Dehydrogenase Conjugates. *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 3759—3766.
- Ngo, T. T. *Enzyme-mediated Immunoassay*; Plenum: New York, 1985.
- Chang, J.; Gotcher, S.; Gunshaw, J. B. Homogeneous Enzyme-Immunoassay for Theophylline in Serum and Plasma. *Clin. Chem* 1982, 28, 361—367.
- Ngo, T. T.; Lenhoff, H. M. Enzyme Modulators as Tools for the Development of Homogeneous Enzyme Immunoassays. *FEBS Letter* 1980, 116, 285—288.
- Ngo, T. T.; Lenhoff, H. M. Antibody Induced Conformational Restriction as Basis for New Separation-Free Enzyme-Immunoassay. *Biochem. Biophys. Res.* 1983, 116, 1097—1103.
- Finley, P. R.; Williams, R. J.; Lichti, D. A. Evaluation of a New Homogeneous Enzyme-Inhibitor Immunoassay of Serum Thyroxine with Use of a Bichromatic Analyzer. *Clin. Chem.* 1980, 26, 1723—1726.
- Blecka, L. J.; Shaffar, M.; Dworschack, R. Inhibitor Enzyme Immunoassays for Quantitation of Various Haptens; A Review. *Immunoenzymatic Techniques*; Avrameas, S., Dmet, P., Mosseyeff, R., Feldman, G., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1983; 207.

22. Burd, J. F.; Wong, R. C.; Feeney, J. C.; Carrico, R. C.; Boguslaski, R. C. Homogeneous Reactant-Labeled Fluorescent Immunoassay for Therapeutic Drugs Exemplified by Gentamicin Determination in Human-Serum. *Clin. Chem.* 1977, 23, 1402-1408.
23. Bogulaski, R. C.; Li, T. M.; Benoric, J. L.; Ngo, T. T.; Burd, J. F.; Carrico, R. C. Substrate Labeled Homogeneous Fluorescent Immunoassays for Haptens and Proteins. *Immunoassays; Clinical Laboratory Technique for the 1980's*; Nakamura, R. M., Dito, W. R., Tucker, E. S., III Eds.; Alan Liss: New York, 1980; 45-64.
24. Walter, B.; Greenquist, A. C.; Howard, W. E., III Solid-phase Reagent Strips for Detection of Therapeutic Drugs in Serum by Substrate-Labelled Fluorescent Immunoassay. *Anal. Chem.* 1983, 55, 873-878.
25. Engel, W. D.; Khanna, P. K. CEDIA In Vitro Diagnostics with a Novel Homogeneous Immunoassay Technology - Current Status and Future Prospects. *J. Immunol. Meth.* 1992, 150, 99-102.
26. Spiehler, V.; Fay, J.; Rogerson, R.; Schorenforfer, D.; Nied Bala, R. S. Enzyme Immunoassay Validation for Qualitative Detection of Cocaine in Sweat. *Clin. Chem.* 1996, 42, 34-38.
27. Halliday, M. I.; Wisdom, G. B. Competitive Enzyme-Immunoassay Using Labelled Antibody. *FEBS Letter* 1978, 96, 298-300.
28. Masseyeff, R. Assay of Tumour-Associated Antigens. *Scand. J. Immunol.* 1978, 8 (Suppl. 7), 83-90.
29. Klein, K. O.; Baron, J.; Colli, M. J.; McDonnell, D. P.; Cutter, G. B. Estrogen-Levels in Childhood Determined by Ultrasensitive Recombinant Cell Bioassay. *Clin. Invest.* 1994, 94, 2475-2480.
30. Watson, R. A. A.; Landon, J.; Shaw, E. J.; Smith, D. S. Polarization Fluoro-Immunoassay of Gentamicin. *Clin. Chim. Acta.* 1976, 73, 51-55.
31. Shaw, E. J.; Watson, R. A. A.; Landon, J.; Smith, D. S. Estimation of Serum Gentamicin by Quenching Fluoro-Immunoassay. *J. Clin. Path.* 1977, 30, 526-531.
32. Weber, G. Polarization of the Fluorescence of Macromolecules. *Biochem. J.* 1952, 51, 145-155.
33. Chen, R. F. Extrinsic and Intrinsic Fluorescence of Proteins. *Practical Fluorescence; Theory, Methods and Techniques*; Guilbault, G. G., Ed.; Ch. 12 Marcel Dekker, Inc.; New York, 1973.
34. McGregor, A. R.; Crockall-Grenning, J. O.; Landon, J.; Smith, D. S. Polarization Fluoro-Immunoassay of Phenytoin. *Clin. Chim. Acta.* 1978, 83, 161-166.
35. O'Neal, J. S.; Schulman, S. G. Fluorescence Polarization Immunoassay of Phenytoin Employing a Sulfonamido Derivative of 2-Naphthol-8-Sulfonic Acid as a Label. *Anal. Chem.* 1984, 56, 2888-2891.
36. Blanchard, G. C.; Gardner, R. Two Immunofluorescent Methods Compared With a Radial Immunodiffusion Method for Measurement of Serum Immunoglobulins. *Clin. Chem.* 1978, 24, 808-814.
37. Kohen, F.; De Boever, J.; Kim, J. B. Recent Advances in Chemiluminescence Based Immunoassays for Steroid-Hormones. *J. Steroid Biochem.* 1987, 27, 71-79.
38. Patel, A.; Campbell, A. K. Homogeneous Immunoassay Based on Chemiluminescence Energy-Transfer. *Clin. Chem.* 1983, 29, 1604-1608.
39. Geiger, R.; Miska, W. Bioluminescence Enhanced Enzyme-Immunoassay: New Ultrasensitive Detection Systems for Enzyme Immunoassays. *J. Clin. Chem. Biochem.* 1987, 25, 31-38.
40. Whitehead, T. P.; Thorpe, G. H. G.; Carter, T. J. N.; Groucutt, C. J.; Kricka, L. J. Enhanced Luminescence Procedure for Sensitive Determination of Peroxidase - Labeled Conjugate in Immunoassay. *Nature (London)* 1983, 305, 158-159.
41. Thorpe, G. H. G.; Moseley, S. B.; Kricka, L. J.; Stott, R. A.; Whitehead, T. P. Enhanced Luminescence Determination of Horseradish Peroxidase Conjugates: Application of Benzothiazole Derivatives as Enhancers in Luminescence Assays on Microtitre Plates. *Anal. Chim. Acta.* 1985, 170, 101.
42. Bronstein, I.; Voyta, J. C.; Thorpe, G. H. G.; Kricka, L. J.; Edwards, B. Chemiluminescent Enzyme-Immunoassay of Alpha-Fetoprotein Based on an Adamantyl Dioxetane Phenyl Phosphate Substrate. *Clin. Chem.* 1989, 35, 1441-1446.
43. Doyle, M. J.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Electrochemical Detection for Alpha-1-Acid Glycoprotein. *Anal. Chem.* 1982, 56, 2318-2322.
44. Heineman, W. R.; Halsall, H. B. Strategies for Electrochemical Immunoassay. *Anal. Chem.* 1985, 57, 1321-1331.
45. Suzawa, T.; Ikariyama, Y.; Aizawa, M. Multilabeling of Ferrocenes of a Glucose-Oxidase Digoxin Conjugate for the Development of a Homogeneous. *Anal. Chem.* 1994, 66, 3889-3894.
46. Schott, H.; Von Cunow, D.; Langhals, H. Labeling of Liposomes with Intercalating Perylene Fluorescent Dyes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992, 1110, 151-157.
47. Kinsky, S. C. Antibody-Complement Interaction with Lipid Model Membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*

1972, 265, 1—23.

48. Litchfield, W.J.; Freytag, J.W.; Adamich, M. Highly Sensitive Immunoassays Based on Use of Liposomes Without Complement. Clin. Chem. 1984, 30, 1441—1445.
49. Kim, C.K.; Park, K.M. Liposome Immunoassay (LIA) for Gentamicin Using Phospholipase-C. Immunol. Methods 1994, 170, 225—231.
50. Wright, S.E.; Huang, L.; J. Liposome Res. 1992, 2, 257—273.

(杜 玥 译)

M

纳米粒给药系统

Elias Fattal, Christine Vauthier

University of Paris XI, Chatenay-Malabry, France

引言

纳米粒是由不可生物降解聚合物或可生物降解聚合物制成的胶体状小颗粒,直径通常在 200nm 左右。纳米粒有两种不同的类型(图 1):一种是纳米球,它是骨架体系的纳米粒;另一种是纳米囊,它则是储库型的纳米粒,由聚合物膜在油性或水性核的周围包裹而成。早在 20 世纪 70 年代,人们就开发了这两种纳米粒给药系统。由于工艺方法简单、易放大生产,所以引起了人们的关注。制得的颗粒稳定且易冷冻干燥。由于这些原因,人们将由可生物降解聚合物制成的纳米粒开发成药物输送系统。实际上纳米粒能有效地实现许多药物的组织靶向,这些药物有抗生素、细胞生长抑制剂、多肽蛋白质、核酸等。此外,纳米粒也能保护药物避免化学降解和酶解,降低某些活性药物的副作用。本章主要关注纳米粒的制备方法和特性,以及纳米给药系统的主要应用。

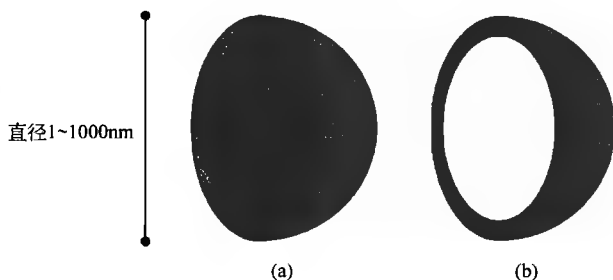


图 1 纳米球 (a) 和纳米囊 (b) 的示意图。

在纳米球中,整个颗粒由连续的聚合物网络组成。

纳米囊呈核-壳结构,由聚合物壳包裹液态核组成

纳米粒的制备

聚合物纳米粒包括纳米球和纳米囊(图 1),它们有很多种制备方法,这些制备方法已发展了至少 30 年,分以下几个阶段:从历史上来说,作为治疗用的第一个药物载体纳米粒是由凝胶和交联血清蛋白制成的^[1,2];后来为了避免使用蛋白质和降低交联剂的毒性,开发了由合成聚合物制成的纳米粒,因为蛋白质可能会刺激免疫系统。最初,采用丙烯酸酯的乳液聚合和甲基丙烯酸甲酯的分散聚合制备纳米粒^[3,4],用作疫苗的佐剂,但是由于它们是由非生物降解聚合物制得的,所以很快就被合成的可生物降解聚合物所代替。Couvreur 等提出用腈基丙烯酸烷基酯类的单体聚合来制备纳米粒^[5],这些单体已作为外科手术胶水用

于体内。他们用酸化的水相制成 o/w 型乳剂,并在乳液中成功地用单体聚合的方法制得纳米粒。在同一时期, Gurny 等提出了基于用其他可生物降解聚合物制备纳米粒的方法^[6],可生物降解聚合物是人们作为手术缝合线用的聚乳酸,这种方法直接将聚合物制成纳米粒。在这些早期研究的基础上,很多研究人员主要通过降低表面活性剂和有机溶剂的用量对原有工艺进行改进和修改。在那时,这些方法只能制备纳米球[图 1 (a)]。1986 年纳米粒的研究有了突破,开发了一种纳米囊的制备方法,制得的纳米囊为核-壳结构,中心为液态,外面由聚合物包裹着^[7~9][图 1 (b)]。自从 1986 年以来制备各种类型纳米粒的新方法不断出现,人们提出了纳米沉淀技术和第一种在反相微乳中进行界面聚合的方法^[10,11]。在随后的几年中,又出现了基于盐析^[12]、乳液-扩散^[13,14]和复乳^[15]的方法。最后一阶段是最近十年,为了开发利用多糖类天然大分子的凝胶特性来制备纳米粒,又出现了一些新方法^[16]。开发这些纳米粒有两个目的:一是用来转运多肽和核酸;二是为了使颗粒在体内循环时间延长,对纳米粒表面进行修饰,以避免静脉注射后被单核吞噬细胞系统的巨噬细胞所吞噬^[17]。

根据纳米粒是在聚合物自身聚合反应同时形成还是由聚合物直接形成得到,可将纳米粒制备方法分为两类,有许多有价值的综述对其进行了论述^[9,18~21],阐述了制备纳米粒的基本原理,详细列举了一些最具代表性的例子。

1. 聚合法制备纳米粒

制备纳米球最常用的方法是乳液聚合法,而纳米囊则是在乳液或微乳中用界面聚合法制备。在乳液聚合中,如果单体本身是液体,那么通过搅拌使单体分散在与其不互溶的连续相中。聚合反应常由引发剂与溶解在连续相中的单体分子发生反应而引发。聚合反应随着单体分子的不增加而不断进行,单体从连续相扩散到不断增长的聚合物分子链中。增长的聚合物分子链是可溶的,当达到某个相对分子质量时则成为不可溶的,因此相分离导致聚合物颗粒的成核现象并产生丁铎尔散射效应。根据维持体系稳定性条件的机理,有核颗粒会进一步生长,这包括俘获新增长的聚合物链、熔合以及有核颗粒间的碰撞^[22]。在整个聚合过程中,乳液连续相中单体的供给是靠从单体液滴中扩散的方式实现的,单体液滴相当于一个单体仓库。当反应完成后,所形成的颗粒含有大量聚合物分子链^[19,22]。乳液聚合可以在无乳化剂的反应体系中进行,也可以在 o/w 和 w/o 的乳液体系中进行。

广泛用作药物载体的聚腈基丙烯酸烷基酯纳米粒是用乳液聚合法制得的,在前面提到过的 Couvreur 等的论文中有介绍^[9]。在磁力搅拌下将单体(腈基丙烯酸异丁酯、腈基丙烯酸异己酯、腈基丙烯酸正丁酯)分散在酸化的连续水相中,酸化水中残留的氢氧根离子快速自发地引发腈基丙烯酸烷基酯的阴离子聚合,根据单体的类型该聚合反应可在3~4h内完成(图2)。为了减缓腈基丙烯酸烷基酯的阴离子聚合反应,通常在低pH(pH约为2.5)的条件下进行聚合,因此允许聚合物像胶体颗粒那样排列。右旋糖酐70或普朗尼克F68(Pluronic® F68)常溶在水相中以确保聚合物颗粒的稳定。纳米球的粒径可以通过调节加入的普朗尼克F68的量来控制,加入的浓度从3%降到0%,纳米球的直径则从40nm变到250nm^[23]。包括阿霉素、抗癌药、多肽类生长激素和一些抗生物在内很多药都已制成纳米球。反义寡聚核苷酸通过和阳离子表面活性剂(溴化十六烷基三甲基铵)以离子对的形式吸附在纳米球表面。最后提一点,某些药物在聚腈基丙烯酸烷基酯纳米粒的制备过程中生物活性会降低。总的来说,这些分子含有能引发腈基丙烯酸烷基酯聚合的化学基团,这些基团以共价键和组成纳米球的聚合物连接。保泰松(一种抗炎药)和阿糖腺苷(一种抗病毒分子)间的相互作用已证实就是这种作用模式。相反副反应可以实现纳米球和特定化合物以共价键连接,使纳米球具有特殊性质。这已用于聚乙二醇包衣的纳米球,聚乙二醇能引发腈基丙烯酸异丁酯发生聚合,因此比根据最初方法制得的纳米球更亲水^[24]。

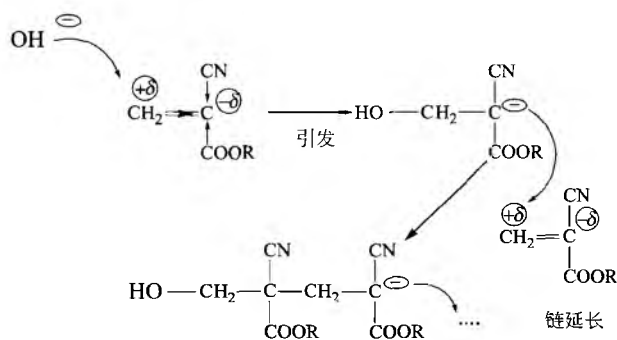


图2 由水分子电离出的氢氧根离子引发的腈基丙烯酸烷基酯的阴离子聚合反应

亚甲基丙二酸酯类是另一种合成可生物降解聚合物的单体,它聚合的机理和腈基丙烯酸烷基酯类似。这些单体通过乳液聚合也可用于制备载药的纳米球^[25]。

腈基丙烯酸烷基酯的界面聚合可以制得纳米囊^[7]。用这些单体制备纳米囊的优点主要是聚合速度很快,和水一接触就开始聚合。通过乙醇相的快速分散可以制备含油纳米囊,在乙醇相中含有乙醇、油、单体以及在表面活性剂水溶液中要包裹的分子。当乙醇扩散到水相中单个的小油滴就形成了,这是因为在油水界面和水接触后在液滴表面

腈基丙烯酸烷基酯发生聚合^[26]。这种方法主要适用于油性药物的包裹^[9],但出人意料的是像胰岛素这样水溶性好的分子也能被这些纳米囊所包裹而且包封率高(高到97%)^[27]。

利用在w/o微乳中腈基丙烯酸烷基酯的界面聚合可以制得含水纳米囊。在该体系中,小且均匀的表面活性剂水溶胀胶束分散在有机相中。为了制备纳米囊,将单体加到已经制成的微乳油相中。在水溶胀胶束的表面引发腈基丙烯酸烷基酯的阴离子聚合反应,局部反应生成的聚合物形成纳米囊的壳。在Gasco和Trotta第一次介绍的方法中,用正己烷作为有机相,Aweosol-OT(二己基琥珀酰磺酸钠)为表面活性剂制备微乳,这两种成分对于开发理想的药物载体系统是不合适的。因此最近对该方法进行了改进,用生物相容性更好的化合物来制备微乳,但仍需使用高浓度的表面活性剂(高达14%的质量分数)^[28]。采用该方法制得的纳米囊分散在有机介质中,主要可用于口服给药。实际上,对于静脉给药关键是将纳米囊转移到连续水相中。但这种转移直到现在还有困难,因为在水中除去有机相和使纳米囊再分散而不引起纳米囊的聚集是比较难实现的。最近,Lambert等提出一种方法^[29],将纯水层上的纳米囊分散体进行超速离心。用这种简单的方法,在离心过程中纳米囊从有机相转移到水相中不会发生任何聚集,而且该方法能除去残留在有机相中多余的表面活性剂。这种方法对于像多肽^[28]和核酸包括反义寡聚核苷酸^[29]在内的这些水溶性分子而言有独特的优势。

2. 用聚合物制备纳米粒

这种方法是直接由聚合物制得纳米粒,是一种完全独立的方法。这种方法的主要优点是组成纳米粒的聚合物有良好的性质,其内在的理化性质不会随着纳米粒制备过程中条件的变化而发生改变,这可能和以前所描述的方法是一致的。大多数由聚合物直接制备纳米粒的方法是利用聚合物的一些理化性质,像溶解度以及在一定条件下聚合物会形成凝胶的性质。总的来说有以下三种方法:第一种是利用聚合物胶体颗粒形成的自发性,当胶体颗粒形成后再使其稳定来制备纳米粒。第二种是在最初用于制备微粒的方法基础上进行一些改进。目的是为了减小用原先方法制得的颗粒的粒径。第三种方法制得的纳米粒很特殊,称为超分子生物载体(supra molecular biovectors)^[30],这种方法将单独介绍。图3总结了用聚合物制备纳米粒的不同方法。

2.1 基于自发形成的纳米粒制备方法

利用溶解的聚合物的溶解度和胶凝特性可以自发形成纳米粒。通常形成聚合物胶体颗粒这一步是可逆的,并且完成使颗粒稳定的第二步操作对制备纳米粒是必要的。

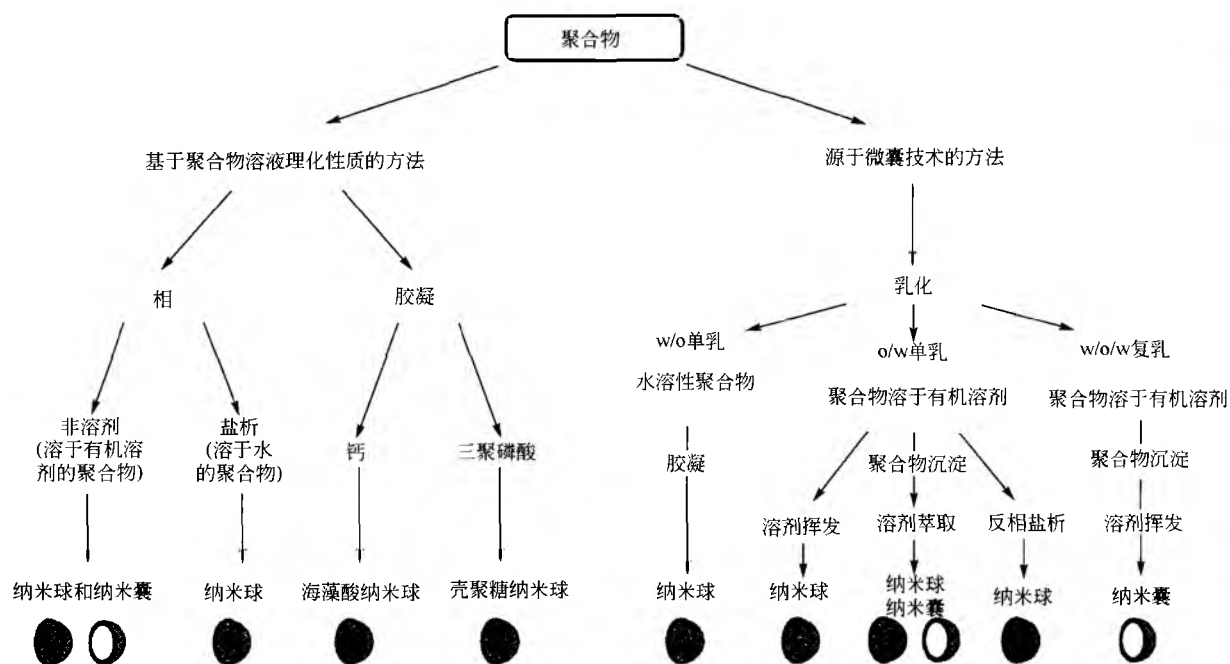


图3 用聚合物制备纳米球和纳米囊的不同方法总结
w/o. 油包水; o/w. 水包油; w/o/w. 水包油包水

根据聚合物溶解度制备纳米粒的基本原理是先制备聚合物溶液,再加入聚合物的非溶剂^[10]或利用盐析效应^[2]使相分离,通过浊度的测量^[2]或用三元相图^[31]来监测相分离的发生。导致聚合物胶体颗粒的相分离常发生在聚合物的稀溶液中,在三元相图中这对应于一个小的区域。就蛋白质而言,用较高浓度的聚合物溶液时胶体颗粒要在相分离限度以上才能形成,这里相分离是用测量浊度的方法来监测的。为了方便地形成聚合物颗粒的胶体分散体,最好是用加完全不互溶的溶剂——非溶剂的方法来实现相分离。在这一过程中,颗粒是自发且近乎瞬间形成的。

一旦发现适合制得聚合物胶体纳米粒的条件,就必须使颗粒稳定。通常可以用蒸发除掉聚合物溶剂的方法或用加聚合物化学交联剂的方法使颗粒稳定,用蛋白质就是一个例子^[32]。

众所周知,纳米沉淀法可用于很多合成聚合物^[10,31]。一般来讲,将聚合物溶解在丙酮中,再将聚合物溶液加到水中,然后蒸发丙酮形成颗粒。通常在水中加表面活性剂以保证聚合物颗粒的稳定。这种简单的纳米粒制备工艺可以放大用于大批量生产,用它可以制备纳米球,只要在聚合物溶液中加入少量的有机油就可以用同样的方法容易地制备纳米囊^[8,9]。当聚合物溶液注入水相时,在溶剂-非溶剂混合物中油就被分散成小的液滴并在油滴表面析出聚合物。用这种方法可制得含油纳米囊,因此对于脂溶性药物,值得用该方法进行包裹。

为了包裹水溶性化合物,在使用蛋白质的基础上对制备工艺进行了很多改进,最近开发了一种工艺可以制备凝胶纳米球,用于基因的转运^[33,34]。

根据某些聚合物具有的胶凝性质,通过控制胶凝过程可以自发地形成纳米粒。该方法已用于海藻酸盐和壳聚糖的纳米粒制备中,海藻酸盐和壳聚糖可以形成高度水溶胀性的凝胶。对于这两种天然多糖来说,它们的胶凝剂分别是钙和三聚磷酸。在多糖和胶凝剂的某个浓度范围内可以形成纳米粒^[35,36]。拿海藻酸盐来说,当海藻酸盐和钙的各自浓度达到在海藻酸盐胶凝过程中预胶凝所需浓度时,就可制得纳米粒[海藻酸盐和氯化钙的浓度分别是0.6% (w/w)和0.9mol/L]。针对这个组成,形成凝胶的小颗粒是由于和钙作用后引起海藻酸盐分子发生分子内和分子间聚集,这些聚集体是因为和聚赖氨酸形成聚电解质络合物而稳定的。正如 Vauthier 和 Couvreur 最近所论述的那样,海藻酸盐和壳聚糖纳米粒可用做核酸和蛋白质的转运载体^[16]。

2.2 从微囊制备技术衍生出来的方法

从微囊制备技术衍生出来的纳米粒制备方法是,首先制备乳液,该乳液的乳滴应尽量小,这样才能制得纳米尺寸的颗粒。要做到这一点可使用一些特殊设备,如高压乳匀机和微型流化床。这些设备产生的能量输入是很重要的,主要是形成高度的湍流和空穴力,它使聚合物溶液在连续相中充分地分散。一旦制得了理想的乳液,就可以按照两种途径来生成纳米粒:一种是聚合物的胶凝;另一种是采用溶剂置换或溶剂蒸发来使聚合物沉淀。壳聚糖、海藻酸盐和琼脂糖分别采用升高pH、加入钙和降低乳液温度的方法实现胶凝。在溶剂置换工艺中,乳液是由聚合物溶剂和含有饱和溶剂的水相组成的,聚合物在水中部分溶解。例

如,一旦乙酸乙酯形成乳液,加水稀释乳液以置换分散相中的溶剂就会导致聚合物析出^[14]。在逆盐析法的基础上这些原则也有了发展^[12]。将聚合物的丙酮溶液分散在含有高浓度盐的水相中,以保证丙酮和水不互溶。用大量的纯水稀释乳液,丙酮会从分散相中被萃取出来,从而导致聚合物析出。用蒸发的方法,丙酮可能除去得比较完全。最后,溶解在分散相中的聚合物沉淀也可以采用蒸发法去除溶剂^[6,37]。这种方法称为乳化-溶剂挥发法,聚合物溶剂扩散到水性连续相中再在气-水界面蒸发。在溶剂完全蒸发过程中乳液要一直保持搅拌状态。用这个方法也可以制备纳米球。为了制备纳米囊,在乳液的分散相中可以加少量的油,采用溶剂置换法制备纳米囊^[13]。纳米囊也可以由水包油包水型复乳采用溶剂挥发工艺制备^[15]。用挥发法除去复乳中间相的有机溶剂会使聚合物在内水相的表面析出。然而采用溶剂置换法制得的纳米囊更适合包裹脂溶性化合物,最新的方法也可以包裹水溶性化合物。

3. 超分子生物载体的制备

超分子生物载体由多糖纳米球和其外周的磷脂双分子层组成^[30]。最初超分子生物载体是为了模拟低密度脂蛋白而开发的,在血液循环中低密度脂蛋白具有少见的天然胶体结构,在体内负责胆固醇和胆固醇酯的转运。超分子生物载体的制备分几步,包括多糖(淀粉或右旋糖酐)的功能化和化学交联,经修饰的多糖的纯化和干燥,然后粉末在高压下粉碎制成小的多糖纳米粒,最后将脂质双分子层吸附到纳米粒的表面。因与这一载体系统相关的分子类型的不同,形成超分子生物载体的核酸多糖化学修饰也有多种可能。实际上多糖核可能具有巨大的应用前景,它可以荷正电荷或负电荷,也可以是中性的。

4. 表面修饰纳米粒的制备

一旦静脉注射纳米粒,则其在体内分布受纳米粒表面性质控制。尽管纳米粒很小,但具有很大的表面积,这使得其和周围介质的相互作用很重要,尤其是对于它们在体内的处置过程。因此从最初为了制备能在血液中长期循环的纳米粒,到近来为了实现药物载体有效的靶向或改善黏膜的生物黏附性,最近十年很关注表面修饰纳米粒的制备。

要使纳米粒能在血液中长期循环,必须不被单核吞噬细胞系统的巨噬细胞所识别。要达到这个目的,在巨噬细胞识别异物的两个已知主要机制中,至少要避免其中一个。这两种机制是颗粒调理机制和补体激活机制,补体激活是先将蛋白吸附再被巨噬细胞识别。蛋白吸附的障碍可能是空间位阻,因此可以将亲水性聚合物包裹或吸附到纳米粒表面。

最初用聚乙二醇包衣的纳米粒是将三嵌段共聚物——PEG-PPO-PEG 简单吸附到已制成的纳米粒表面^[38]。为了提高聚乙二醇(PEG)包衣的稳定性,采用纳米沉淀法或乳化-溶剂挥发法制备乳酸-乙二醇共聚物纳米粒或腈基丙

烯酸烷基酯-乙二醇共聚物纳米粒^[17,39~41]。最后,用聚乙二醇引发腈基丙烯酸烷基酯的聚合,采用乳液聚合法制备聚乙二醇包裹的腈基丙烯酸烷基酯的纳米粒^[24,41]。

为了避免纳米粒发生补体激活作用,Passirani 等提出了用肝磷脂包裹纳米粒^[42]。肝磷脂是一种多糖,在体内是补体激活作用的生理抑制剂。采用乳液聚合法可以制得肝磷脂包裹的聚甲基丙烯酸甲酯纳米粒。按照最初的方法要用到铯离子,肝磷脂以共价键连接到聚甲基丙烯酸甲酯上,在现在的方法中,肝磷脂引发甲基丙烯酸甲酯发生自由基聚合。

现在下一步是开发靶向特定细胞类型的纳米粒。Stella 等最近已对此进行了研究^[43],制备了聚腈基丙烯酸烷基酯纳米粒,在该纳米粒表面具有叶酸残基,这样的纳米粒可用于靶向过量表达叶酸膜受体的癌细胞。由叶酸组成的靶向部分接枝到氨基胍基聚乙二醇-腈基丙烯酸十六烷基酯共聚物纳米粒表面,该纳米粒用纳米沉淀法制得。

另外一种途径是用壳聚糖作为纳米粒包衣剂以提高口服或鼻腔给药后纳米粒的生物黏附性^[44]。实际上,壳聚糖不仅具有生物黏附性,而且具有促进吸收的作用。

纳米粒药物载体的表征

纳米粒可以用所有适用于聚合物胶体的不同理化方法来进行特征化^[45]。考虑到作为药物载体的纳米粒开发过程,人们对主要的理化参数进行研究,包括形状、尺寸、表面性质、相对密度以及颗粒浓度^[19]。粒径及其分布是决定是否可以安全地用于静脉注射的重要参数。表面性质也是值得重视的,因为纳米粒具有很大很特别的表面,对外周介质的相互作用影响很大。当大量颗粒聚集在一起时,需要有一定的相对密度和浓度以减小颗粒的特殊表面积。

用不同的显微技术可以观察到纳米粒。通常用透射电子显微镜观察纳米粒,首先检查颗粒没有被染色剂染色,然后用磷钨酸或乙酸二氧铀进行负染色。现在随着透射电镜技术的进步纳米粒可以不用任何染色剂染色而直接观察,因染色剂有时会引起一些假象。特别是在极低温度条件下,冷冻的纳米分散体样品,可以用冷冻透射电子显微镜直接观察纳米粒。扫描电子显微镜也可观察样品,样品要用薄薄一层金属包裹,这样可以形成反差。利用这些技术和原子力显微技术可呈现出纳米粒外观的有用图像。测量粒径及其分布需要逐个测定纳米粒直径,这可以用图像分析软件进行辅助。纳米粒的内部结构可以用冷冻破碎和冷冻透射电子显微镜进行观察。

总的来说,纳米粒平均粒径和粒径分布用准弹性散射法进行评价,该方法也称为光子相关光谱法。它是利用评价平移扩散系数(D)进行测量的,平移扩散系数是描述纳米粒的布朗运动的参数。 d_H 是纳米粒的流体力学直径,它是从 Stokes-Einstein 法则中推演出来的参数。

其他一些方法也可以用于测量纳米粒的粒径及其分布。场流分离法是按照在细玻璃通道中纳米粒大小进行分离的



方法,在细玻璃管中纳米粒在由交叉流动或沉降作用产生的外部垂直力作用下流动^[46,47]。该方法可用于测定从10nm到数百微米的宽粒径范围,今后对粒径测定和纳米粒表面分析会引起更多的关注^[48]。纳米粒的粒径及其分布也可以用适当的凝胶排阻色谱进行测定。这种方法比前面所讲方法需要的仪器少,主要的局限是直径小于120nm的颗粒才能用该方法^[49]。

正如前面所提到的,纳米粒的表面性质对纳米粒和周围环境介质的相互作用是很重要的。纳米粒的主要表面特性是电荷、亲水性、吸附蛋白质以及诱导补体激活的化学组成和能力。

纳米粒表面的电荷常用测量的 ζ 电位来表示, ζ 电位给出了关于整个颗粒表面的电荷情况以及如何受环境改变的影响^[50]。 ζ 电位受纳米粒表面组成以及有无吸附化合物的影响,也受分散相组成的影响,主要是分散相的离子强度和pH。

纳米粒表面的亲水性可用疏水相互作用色谱来评价^[51]。它是基于亲和色谱的一种方法,能快速区分亲水性和疏水性纳米粒。当纳米粒通过疏水相互作用的凝胶色谱柱时,认为被凝胶保留的纳米粒和只有在加入表面活性剂后才被洗脱的纳米粒是疏水的,而不与凝胶相互作用的纳米粒和直接从柱子洗脱出来的纳米粒则认为是亲水的。除了疏水相互作用色谱以外,最近场流分离技术也有可能用于表征具有不同表面特征的纳米粒^[48]。

X射线光电光谱(ESCA)可用于测定纳米粒表面的化学组成,对于开发表面修饰的纳米粒是一个非常有用的工具,它可以提供人们所认为的存在于纳米粒表面的成分的直接证据^[38,41]。

吸附蛋白质和静脉注射后在体内激活补体的纳米粒的体积会影响其在体内的消除和分布。为了考察这方面的影响,建立了体外试验来研究在血清中孵化后吸附到纳米粒表面的血清蛋白的类型,并评价纳米粒诱导补体活化的能力。吸附到纳米粒表面的蛋白质可以用聚丙烯酰胺凝胶电泳来分析。该方法可鉴别吸附到纳米粒表面的蛋白质^[52]。根据毛细管电泳建立的快速方法可用于评价吸附的蛋白质组成随时间的变化情况^[53]。最终,由纳米粒引起补体的活化作用既可以用常规方法来评价,也可以用测定C3部分特有活化作用的特殊方法来评价。在常规方法中,用血清来孵化纳米粒,并在孵化后用红细胞溶解试验来评价血清中仍未被激活的补体^[54,55]。

在分散体中纳米粒的浓度可从质量分析或根据Mie氏定律测定浊度推断出^[48,56]。纳米粒的相对密度可以用测比重法^[57]或等密度离心法^[13,58]来测量。

纳米粒在药剂学中的应用

纳米粒是在20世纪70年代中期由Birrenbach和Speiser首先提出的^[3]。随后用生物可降解聚合物制得的纳米粒被用于设计药物输送系统,认为生物可降解聚合物是最适

合用于人体的^[5]。在那时,有关胶态载体的研究主要集中在脂质体,但没有人能制备稳定的脂质载体用于临床。在某些情况下,由于纳米粒具有较好的稳定性,因此纳米粒比脂质体效果更好^[59]。这是因为在过去的十年中许多药物都和纳米粒有关,如抗生素、抗病毒药、抗寄生虫药以及细胞抑制剂、蛋白质和多肽。

1. 静脉给药

1.1 静脉给药后纳米粒的消除以及浓度

纳米粒引人关注的主要是它能够到达靶组织,增加药物向细胞内渗透。静脉注射后,纳米粒被肝脏、脾脏摄取以及较少的一部分被骨髓摄取^[60]。在这些组织中,纳米粒主要是被单核吞噬细胞系统(MPS)的细胞所摄取^[61]。通过内吞作用摄取后,颗粒在溶酶体中消化,降解成低相对分子质量的可溶性化合物,最后通过肾脏的排泄作用从体内排出^[62]。由于单核吞噬细胞系统位于特定的靶部位,某些器官可以避免受到活性化合物的影响,从而减少毒副作用。由于它们具有较强的溶酶体定位作用,因此人们能推测纳米粒不适合靶向细胞质。为了避免纳米粒被溶酶体诱捕,将一些使溶酶体膜破坏的化合物加到纳米粒体系中(如阳离子表面活性剂)^[63],该纳米粒体系可以使药物递送到细胞质中。为了避免被单核吞噬细胞系统摄取,最近开发一种方法,由聚乙二醇衍生物连接纳米粒组成^[39,64,65]。这种连接使纳米粒较少地被单核吞噬细胞系统摄取,在体内有较长的循环时间。由于实体瘤的存在,内皮是有渗透性的,因此这些所谓的stealth[®]纳米粒(隐形纳米粒)可以从内皮渗出。

1.2 细胞内感染治疗中的应用

对于用纳米球进行药物输送,细胞内感染是重要的一方面。实际上,感染的细胞可能形成微生物的储库,在溶酶体内微生物可以免受抗生素的作用。细胞内感染对化学治疗的耐受性与常用抗生素的低摄取或在溶酶体的酸性pH下活性降低有关。为了克服这些影响,人们提出将氨苄青霉素、 β -内酰胺抗生素结合到纳米球上作为可细胞内吞制剂^[66]。在两例实验细胞内感染的治疗中测试了聚异己基聚丙烯酯(PIHCA)纳米粒的效力。

首先,在治疗实验性单核细胞增多性李斯特(氏)菌感染先天性无胸腺裸鼠中试验了氨苄青霉素纳米球,该模型是一种肝脾巨噬细胞的慢性感染^[67]。纳米粒吸附了氨苄青霉素后,发现氨苄青霉素的治疗活性比游离药物显著增强。氨苄青霉素连接到PIHCA纳米粒后肝脏中细菌数至少减少了20倍。此外,当注射两剂含药0.8mg的纳米球后,纳米球的氨苄青霉素能确保杀死肝脏的细菌,然而其他任何试验的疗法都没有发现有杀死肝脏细菌的效果。在治疗结束后肝脏再次出现活细菌可能是由于其他器官(如脾脏)引起的二次感染,用这种疗法不能彻底杀灭细菌^[67]。

其次,在C57/BL6鼠的实验性沙门氏菌治疗中对氨苄

N

青霉素纳米粒进行了试验,该模型是一种急性致命感染^[66]。注射单剂量氨苄青霉素纳米粒治疗的所有小鼠都存活了,但所有对照小鼠和所有用未载药纳米球治疗的小鼠在感染后 10 天死亡。用游离氨苄青霉素,要产生有效的药物疗效需要每剂为 32mg 的三倍剂量。较低剂量 ($3 \times 0.8\text{mg}$ 和 $3 \times 16\text{mg}$) 可以推延死亡但不能减少死亡率。因此,当药物结合到纳米球上,根据小鼠死亡率计算的氨苄青霉素治疗指数增大了 120 倍。

为了阐述纳米球能提高氨苄青霉素抗菌效力的机理,Forestier 等在小鼠腹膜巨噬细胞中利用单核细胞增多性李斯特(氏)菌的存活情况比较了氨苄青霉素的聚异丁基腈基丙烯酸酯(PIBCA)纳米球和游离氨苄青霉素的体外效力^[68]。孵育 30h 后,与对照相比含有氨苄青霉素的纳米球使存活的细菌减少 99%,而游离氨苄青霉素则细菌数量只有很少的下降。因此,对于抑制细胞内单核细胞增多性李斯特(氏)菌的生长纳米粒的氨苄青霉素比游离的要更有效。尽管氨苄青霉素的细胞内捕获显著增加以及细胞外液流失减少,但氨苄青霉素的 PIBCA 纳米球的杀菌效果不佳,因此在体外用鼠伤寒沙门氏菌感染巨噬细胞是很复杂的^[69]。在另一项研究中,共焦显微镜和透射电子显微镜被用于确证氨苄青霉素 PIBCA 纳米球的细胞内转运以及亚细胞腔内与细菌的关系^[70]。测得的数据清楚地说明了鼠巨噬细胞吞噬氨苄青霉素 PIBCA 纳米球的主动摄取过程,并作为感染的细菌定位在上述液泡中而不是限制摄取通路^[70]。因此很难解释氨苄青霉素纳米球的有限杀菌作用。最可能的解释是含有阻止吞噬小体-溶酶体融合的鼠伤寒沙门氏菌的耐受机理^[71],这使一些细菌在吞噬小体中不受纳米球的作用。如果提出的假设(阻止吞噬小体-溶酶体融合)是正确的,体内显著的效果应该由于受感染器官的特定靶位(富有网状内皮组织细胞),而不是由于有效的细胞内靶位。

为了消灭处于细胞分裂期和细胞不分裂期的细菌,将氟代喹诺酮类抗生素——环丙沙星连接到 PIBCA 和 PIHCA 纳米球上。在顽固沙门氏菌感染的动物模型中,尽管观察到了对感染早期的作用,但无论游离的还是和纳米球结合的环丙沙星都不能真正根除顽固的细菌^[72]。

由于纳米球在 MPS 中累积,因此纳米球有希望成为用于治疗内脏利什曼病的药物载体^[73]。PIHCA 纳米球可被用作伯氨喹的载体,当其与纳米球连接后,其抗细胞内杜氏利什曼原虫的活性增强 21 倍^[74]。其部分活性归结于纳米球的吞噬作用引起突发性呼吸,在受感染的巨噬细胞中这种现象比在不受感染的更显著^[74]。去氢依米丁也是治疗的候选药物之一,但有某些心脏副作用,当和纳米球连接后副作用降低了^[75]。

1.3 癌症治疗中的应用

静脉注射抗癌药后,由于药物分子理化性质的作用抗癌药将全身分布。只有以体内其余部位有很高药物浓度为代价,抗癌药在肿瘤组织才能达到药理活性浓度。对于抑制细胞生长的化合物,由于其特异性差导致毒性增强,这

给有效治疗带来了很大困难。使用胶体药物载体可能是一种更合理的治疗特殊癌症的方法。此外,通过使用抑制细胞生长的纳米球可以实现克服多重耐药性。

用淋巴白血病 L-1210 作为肿瘤模型测定了阿霉素纳米球的抗肿瘤效果。在这项研究中,静脉注射阿霉素 PIBCA 纳米球抗 L1210 白血病的效果比以游离形式按相同剂量表给药的效果要好^[76]。尽管注射阿霉素 PIBCA 纳米球小鼠增加的寿命(用 ILS% 表示)是注射游离阿霉素增加寿命的两倍,但没有长期存活的。

阿霉素 PIHCA 纳米球抗 L1210 白血病的效力甚至比阿霉素 PIBCA 纳米球更高。连接到纳米球上后,药物的毒性显著降低,鉴于在相同剂量下游离阿霉素的治疗作用被药物毒性完全掩盖,这样的制剂也可以得到令人满意的结果^[76]。此外,初步试验表明在患有 L1210 的小鼠上,静脉推注阿霉素纳米球比游离药物滴注 24h 更有效。

后来在鼠肝癌转移模型(M5076 网状细胞肉瘤)中证实了阿霉素借助于聚腈基丙烯酸烷基酯靶向的优越性^[77]。不管剂量和给药时间表,尤其是当确定癌细胞转移时如果仅仅用阿霉素进行治疗,用阿霉素纳米球的癌细胞转移数下降得比用游离阿霉素的多。正如组织学检查所明确证实的,当阿霉素以纳米粒的形式给药时,提高靶向药物的功效使肿瘤节结的数量和大小都减小了^[77]。此外,用靶向药物纳米球治疗的动物,其肝脏活组织切片检查表明肿瘤组织内的癌细胞密度较低。对照组和游离阿霉素治疗组出现细胞坏死常要比含药纳米球治疗组普遍。

对健康小鼠和癌细胞转移小鼠的肝脏组织匀浆进行研究,结果表明阿霉素纳米球被肝脏大量摄取,而且两者在肝脏中的浓度没有差异^[77]。为了阐述阿霉素纳米球增强疗效的机理,建立了转移节结和邻近健康肝脏组织中阿霉素的测定方法。这就提供了这些组织中有关药物分布的定量信息^[78]。在给药后的最初 6h,阿霉素在肝脏的量是阿霉素纳米球的 18 倍。然而,用电子显微镜可以观察到纳米球和肿瘤组织没有特异的亲和性,却定位在 Kupffer 细胞(巨噬细胞)中。但在随后的时间点,用纳米球治疗的动物在其肿瘤组织中,药物的量增加到给予游离阿霉素动物中测得量的 2.5 倍。由于肿瘤组织不可能摄取纳米球,因此肿瘤组织中阿霉素浓度的增加可能是从被健康组织(尤其是 Kupffer 细胞)摄取纳米球后释放出的阿霉素而造成的。肝脏组织起到了药物储库的作用,延长了游离药物向邻近癌细胞的扩散作用,游离药物是从被 kupffer 细胞的溶酶体摄取的纳米球中释放出来的。

这种假设就引出了一个问题,即肝脏中阿霉素浓度增大 18 倍后长期影响的问题。就高剂量下存活率、体重减轻以及组织学外观而言,尽管毒理学数据表明阿霉素纳米球对肝脏没有显著的或不可预知的毒性^[79],但造成毒性的这种可能性还是会在心里产生,特别是在在用阿霉素脂质体治疗大鼠时发现 Kupffer 细胞数量暂时性消耗以及由此造成清除细菌能力的下降^[80]。用不含药聚腈基丙烯酸烷基酯纳米粒来进行系统研究,以此来确证在重复剂量给药后肝



脏的噬菌细胞的吞噬能力是可逆性下降的,而且轻微的炎症反应也是可逆的^[81,82]。阿霉素纳米粒也可聚集在骨髓里,导致骨髓抑制^[83]。然而,载体的这种趋向性可能有利于骨髓促进剂的转运,如粒细胞群刺激因子反转大剂量化疗的抑制作用^[84]。纳米球也可被脾脏的吞噬细胞吞噬^[85]。在这项研究中,纳米球被脾脏摄取是由于脾脏结构的原因:对于小鼠,主要认为是脾脏边缘部分的嗜金属巨噬细胞进行摄取;而对于大鼠,其具有与人类相似的窦状小管的脾脏,在脾髓巨噬细胞中可以发现纳米粒。

另外,在某些情况下连接到纳米球上的药物分布变化可能大大降低药物的毒性,因为减少了药物在组织中的蓄积,药物在组织中蓄积可使组织产生最严重的急性毒性。这一点可由阿霉素表现出的严重急性和慢性心肌症来阐明。当阿霉素吸附到纳米球上,小鼠静脉注射后,血浆中阿霉素的浓度是较高的,同时药物在心脏的浓度显著降低^[86]。与观测到的分布情况一致,当阿霉素连接到纳米球后毒性比游离阿霉素的毒性要低^[78]。

肿瘤细胞对多种亲脂性药物能逐渐产生同时耐药性是癌症化疗中的主要问题。对蒽环类药物的细胞耐药性是因为活性药物从连接有跨膜 P-糖蛋白的耐药细胞中流出,这在父代药物敏感细胞系中没有发现。像阿霉素这样的药物是通过被动扩散穿过脂质双分子层进入细胞的。在进入细胞后,药物和 P-糖蛋白结合,这样形成跨膜通道并利用 ATP 水解产生的能量将这些药物泵出细胞^[87]。为了解决这个问题,许多作者提出使用 P-糖蛋白竞争抑制剂,例如,钙通道阻滞剂维拉帕米,它能够结合 P-糖蛋白并克服多重耐药性。然而,由于维拉帕米的不良反应严重,因此其临床用于克服多药耐药性受限。

在过去的几年里,许多研究专注于评价含药复合物的抗肿瘤作用^[88]。阿霉素的耐药性被认为是和 P-糖蛋白的存在有关,因此评价了阿霉素纳米球的疗效。将游离阿霉素、阿霉素 PIHCA 纳米球 (NP-阿霉素, 平均粒径为 300nm) 和不含药纳米球 (NP) 的细胞毒性以及抵抗敏感的 (MCF7) 和多药耐药的 (阿霉素 R MCF7) 人乳腺癌细胞系的作用进行了比较^[89]。MCF7 细胞比阿霉素 R MCF7 细胞对游离阿霉素要敏感,在 IC_{50} 时敏感性相差 150 倍。用游离阿霉素或阿霉素纳米球治疗, MCF7 的存活率没有显著差异。当阿霉素纳米球代替游离阿霉素时,相比而言,对于阿霉素 R MCF7 来说阿霉素的 IC_{50} 要低 130 倍^[89]。对于具有细胞毒性的阿霉素导入多重耐药的人癌细胞系阿霉素 R MCF7 中,这些结果表明纳米球是一种有效的载体。

用其他敏感的和耐药细胞系进行了一些补充试验,这些试验已经证实纳米球的功效^[90,91]。在试验的大多数细胞系中,阿霉素耐药性被避免,并且在体内 P388 产生腹水的模型中得到了一些令人鼓舞的结果^[90]。为了阐明聚脲基丙烯酸烷基酯纳米粒的作用机制,人们进行了深入的研究。孵育时间和每个细胞中的微粒数是重要因素。与游离药物相比,当使用 PIBCA 纳米球时,尽管没有出现纳米球内存作用,但阿霉素在 P388/ADR 耐药性白血病细胞中蓄积量

是增加的^[93]。另外,当使用较少的快速降解 PIHCA 纳米球时,在没有增加细胞内药物的情况下出现了反转^[94]。尽管聚脲基丙烯酸烷基酯纳米粒的降解产物 (主要是聚脲基丙烯酸) 能溶解在培养介质中,但它们仍能增加阿霉素的蓄积和细胞毒性。因此,耐药性的反转是由于细胞表面纳米球的吸附以及阿霉素与聚脲基丙烯酸形成离子对,这样促进了药物通过细胞膜的转运^[94]。

根据早期所述的用阿霉素纳米球在肝癌细胞转移模型中得到的结果^[77],在体外由耐药的和敏感的 P388 细胞组成的双室共同培养体系中,对巨噬细胞作为阿霉素储库的作用进行了测试^[95]。在被巨噬细胞优先摄取后,阿霉素 PIBCA 纳米球仍能克服耐药性,但只是部分的反转。因此决定利用微粒药物载体,并提出将抗癌药和 P-糖蛋白抑制剂联用。用阿霉素和环孢素与相同的纳米球连接对该方法进行了试验,发现该方法对逆转 P388 耐药性非常有效^[95]。环孢素与纳米球的连接确保了它能像抗癌药一样到达相同的部位,并且降低它的毒副作用。

早在 1986 年,Al Khouri 等观察到像其他胶体载体一样,当在家兔体内静脉注射纳米囊后,纳米囊被单核噬菌细胞系统快速摄取^[96]。一种利用这种摄取的应用就是胞壁酰三肽胆固醇 (MTP-Chol) 纳米囊。这种免疫刺激剂能激活巨噬细胞,导致肿瘤细胞的毒性,因此这将是治疗转移癌的有用药物。用激活巨噬细胞抑制肿瘤扩散的机理是产生一氧化氮和 $TNF-\alpha$ 。在大鼠牙槽巨噬细胞的体外模型和 RAW 264.7 小鼠单核细胞的巨噬细胞系中,含有 MTP-Chol 的聚 D, L-丙交酯纳米囊是比游离药物更有效的激活剂^[97,98]。这种作用可能是由于在纳米囊被吞噬后被包裹的免疫调节剂在细胞内转运,以及药物通过中间媒介转移到血清蛋白中^[99]。该系统在体内也已证明了它的有效作用。Barratt 等报道了 MTP-Chol 纳米囊在肝癌转移的模型中抑制转移的作用^[100]。

1.4 寡核苷酸转运的纳米球

因为寡核苷酸在正义和反义策略中对特定的基因产物敏感,所以寡核苷酸可能是很有效的药物。但在治疗中用反义寡核苷酸对制药技术是一种挑战,因为它对酶的降解敏感并且对生物膜的渗透性差。由于纳米粒制剂在生物体液中较稳定,它可能是一种受关注的选择。就由合成聚合物 (聚脲基丙烯酸烷基酯、聚乳酸) 制得的纳米球而言,因为寡核苷酸对聚合物基质没有亲和性,所以寡核苷酸与纳米粒的连接是通过离子对和阳离子表面活性剂吸附到纳米粒表面形成连接的,如十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)^[101]。用这种方式将寡核苷酸连接到聚脲基丙烯酸烷基酯纳米球上在体外可免受核酸酶的破坏^[63],并且增加它们细胞内的摄取。此外,纳米球能将完整的寡核苷酸富集在肝脏和脾脏^[103]。用该方式构造的反义寡核苷酸能在裸鼠中特定的抑制变异的 Ha-ras-mediated 细胞的增殖和致癌性^[104]。

最近已经将该方法应用到指向 PKC α 基因的 3'端非转

译区的磷酸二酯反义寡核苷酸与用 PIBCA 制得的纳米球的连接上。这些纳米球能抑制 PKC α 在培养的 Hep G6 细胞中的新表达^[105]。

含寡核苷酸的纳米球也有用天然多糖来制备的,如海藻酸盐在钙离子存在时可形成凝胶。在这种情况下,寡核苷酸在表面蠕动的作用下渗入凝胶基质中,从而得到高载药量和良好的抗核酸酶的保护作用^[106]。

2. 皮下/肌肉给药

纳米粒的皮下注射主要用于实现多肽和疫苗的输送。包裹在纳米粒中的药物可缓慢释放,因此可减少给药次数,增加药物在血中的半衰期,最终在某些情况下可降低副作用。

将 PIBCA 纳米球注射到大鼠皮下。使用放射标记的聚合物得到放射自显影照片,照片显示在肌肉组织中着色逐渐变淡,这暗示着纳米球缓慢降解^[107]。在同样的研究中,发现多肽(GRF)是以缓慢的方式从纳米球中释放的。比较游离 GRF 和 GRF 纳米球的 AUC,表明除了释放过程是缓慢释放以外,纳米球能提高多肽的生物利用度。这种生物利用度的提高是由于注射的游离 GRF 在注射部位被快速代谢,而注射含药纳米球时多肽被部分保护起来免受大量的酶降解^[107]。

在文献中介绍了一些用纳米球作为抗原/过敏原输送佐剂的例子。这种方式的主要优点是可设计单次注射的疫苗。在这种情况下,药物载体必须保留在给药部位,并连续或脉冲地释放抗原。由于多肽或蛋白质的释放是更适合缓慢释放的,因此采用缓慢降解聚合物(PLA、PMMA)是合适的。聚甲基丙烯酸甲酯是第一个作为可注射疫苗佐剂被研究的^[108,109]。这些纳米球被声称在皮下或肌肉注射后可生物降解,并表现出对许多抗原具有非常有效的佐剂性质。但在聚合过程中将抗原结合到纳米球上比吸附到纳米球上表现出来的佐剂性质要好^[110]。当比较 PMMA 和其他聚合物(聚苯乙烯和甲基丙烯酸 2-羟乙基酯/甲基丙烯酸甲酯共聚物 HEMA; MMA)时,证明了对流行性感冒完整和裂解病毒、牛血清蛋白和 HIV2 裂解病毒免疫后减小粒径和增加纳米球的疏水性将增强抗体应答^[111~113]。

3. 口服途径

许多报告表明动物口服纳米粒和微粒后会发生纳米粒和微粒的摄取和转移^[114~116]。为了解释微粒通过肠道发生转移,许多不同的机理被提出:①通过皮氏结或孤立淋巴滤泡摄取;②细胞内摄取;③细胞内/细胞间通路。Damgé 等揭示了聚丙烯酸烷基酯纳米囊是被皮氏结摄取的^[116]。当在大鼠离体回肠腔内给药后,聚丙烯酸烷基酯纳米囊被发现大量快速地通过皮氏结^[116]。在淋巴细胞周围 M 细胞和细胞内空隙中可以清楚地看到纳米囊。口服用¹⁴C 标记的聚丙烯酸己酯(PHCA)纳米球后,根据电子显微镜的放射自显影研究了进入上皮和杯状细胞的放射强度,Kreuter 等提出纳米球的细胞内摄取^[117]。在 Aprahamian 等用 PIBCA

纳米囊所做的研究中,微粒通过细胞间隙通路进行转移得到证实^[118]。为了用配有能量色散 X 射线分光计的扫描电子显微镜观察纳米囊,将纳米囊中充满碘化油(lipiodol)。当在狗离体空肠中给药后,纳米囊和腔内黏液结合成囊泡。然后发现纳米球在毛细血管内与红细胞紧密接触或吸附在内皮细胞内壁。在这三种机理中以及根据许多用其他可生物降解或非生物降解聚合物制得的纳米球研究,口服纳米球在皮氏结摄取后转移是主要的快速重要通路。尽管在某些情况下这是可能存在的,但如果细胞间的紧密连接没有被破坏的话,在可吸收性细胞之间的微粒通路是更不可能的。尽管不同的独立研究者有很多报告都证明了微粒是通过消化道吸收的,但纳米粒的口服吸收仍存在争议。即使吸收颗粒的量有明确的估计并充分考虑了影响颗粒摄取的因素,像聚丙烯酸烷基酯纳米粒这样的小颗粒发生迁移是可能的。问题是颗粒迁移的范围是否和治疗所设想的给药方案相一致。这将在下面讨论。

4. 多肽、蛋白质和疫苗的口服给药

10 年前,聚丙烯酸异丁酯纳米囊就可以包裹胰岛素并增强它的活性,这一点可用血糖降低来评价^[119]。这个结果的很多方面是令人惊讶的:在纳米囊的油性核中包裹亲水性药物;血糖的降低只是用糖尿病动物得到的;尽管胰岛素药理效应(最低的血糖浓度)的强度不依赖于剂量,但单剂量给药后两天出现血糖过低,根据胰岛素的剂量血糖过低一直可持续到 20 天。Damgé 等^[116]及 Lowe 和 Temple^[120]提出在肠液中纳米囊可以保护胰岛素免受蛋白水解的降解,理由是在体外存在不同的酶时,包裹的胰岛素受到保护。后来的研究表明在纳米囊形成过程中胰岛素不和丙烯酸烷基酯单体发生反应,胰岛素溶于油性核中而不是吸附在纳米囊的表面^[121]。

Damgé 等提出通过肠壁迁移可解释胰岛素纳米囊降低血糖的能力^[116]。例如,通过细胞间通路或皮氏结中的 M 细胞^[122]。最近,为了更容易观察它们的迁移,要求采用 Texas Bed® 标记的胰岛素^[123]。口服 1h 后,纳米囊可达到回肠。在黏膜中甚至在固有层中,存在荧光区意味着胰岛素纳米球能穿过肠上皮细胞。尽管这可能是重要的因素,但并不能解释持续的低血糖。延迟作用可能是由于部分胶体在胃肠道中的滞留。

有趣的是当包裹在聚丙烯酸烷基酯纳米球中的胰岛素分散在含表面活性剂的油相中时,也发现了延长降血糖的现象^[124]。这暗示着纳米囊的一些成分能起到吸收促进剂的作用。

最近, Damgé 等指出口服给药后在聚丙烯酸烷基酯纳米囊中生长激素抑制激素类似物奥曲肽的连接也可提高并延长其治疗效果^[125]。

口服聚丙烯酸烷基酯纳米粒主要受到通过肠壁途径的限制,而且有时也不稳定,即便这样,这也是抗原口服给药引起关注的方法。实际上,口服给药后 M 细胞是摄取聚丙烯酸烷基酯纳米粒的主要部位^[116]。此外,通常公认有限的抗原就足以使黏液免疫。抗原的口服给药可以被认为是

产生 IgA 抗体应答最方便的方法。但是在胃肠道里抗原的酶降解作用以及吸收差使得口服抗原受到很大限制。因此,假定如果微粒或纳米粒能起到保护抗原分子的作用,那么口服抗原的微粒或纳米粒一定就是有效的。口服卵白蛋白的聚丙烯酸烷基酯纳米粒后,表明其能增强分泌腺的免疫应答^[126]。在用聚丙烯酰胺制得相同抗原纳米粒的情况下,上述结果并没有完全重现。据推测是由于在聚丙烯酰胺纳米球载药时,大量的抗原在聚合物的表面,通过消化道时抗原会降解。吸附在聚丙烯酸丁酯纳米球上的卵白蛋白具有较高的表面浓度,这可能降低消化道中蛋白水解酶的活性以使抗原进入体内代谢,从而导致抗原的利用度较高。

5. 眼用给药

眼睛的解剖结构以及保护性作用对眼用药物的输送具有很强的防御作用。这是常用眼用剂型为什么具有极低生物利用度的原因。药物经亲脂性角膜屏障吸收是有限的,这主要是由于眼泪的回转、滴入的药物经泪流快速由鼻泪管排出,以及经结膜非生产性的吸收导致药物在角膜前的滞留时间短。在使用的药物中只有小部分(1%~3%)透过角膜进入眼内组织。由于这些原因,有必要开发有效的、更能让人接受的眼用治疗系统。

为了延长角膜前的滞留时间和(或)提高活性成分的透过性,采取了不同的方法。其中有一种方法是用胶体药物给药系统,如纳米粒。早期研究是用纳米囊作为眼用药的载体,试图通过延长角膜前的滞留时间来增强亲脂性药物的渗透,其他胶体系统还有脂质体和纳米球。有关将抗青光眼药包裹在纳米囊中的研究,如倍他洛尔、卡替洛尔和美替洛尔,仅仅表明和游离药物相比,非角膜吸收的减少导致副作用的降低^[127~129]。全身性的副作用是由于药物在眼内滞留短,药物经结膜和鼻血管直接吸收进入全身循环。在纳米囊中包裹倍他洛尔和卡替洛尔这两种药物,其产生的药理效应(眼内压的降低)比游离药物以及纳米球(尽管没有测试纳米囊的渗透性)要有所提高,并且降低了心血管系统的副作用^[127,128]。和倍他洛尔和卡替洛尔一样,单用美替洛尔也具有相同的活性,但包裹在纳米囊中则减少了其副作用。当使用倍他洛尔时,发现包裹纳米囊的聚合物性质是重要的,聚 ϵ -己内酯比 PIBCA 和聚乳酸羟基乙酸更有效^[127]。

为了更好地理解由抗青光眼药研究所得到的药理反应,Calvo 等阐述了纳米囊和眼组织相互作用的机理^[130]。用共聚焦显微镜观察,发现聚 ϵ -己内酯纳米囊能通过内吞作用特异地透过角膜上皮细胞,而不引起细胞的损伤,但 PIBCA 纳米粒的摄取却伴随着细胞的溶解^[131]。通过增强亲脂性药物的角膜上皮细胞透过性,由聚 ϵ -己内酯纳米囊得出的结果可以解释提高治疗效果和减少药物通过结膜降低全身副作用的原因。Marchal Herssler 等观察到纳米囊的治疗效果要比纳米球的好^[128],对照 Marchal Herssler 等和 Calvo 等的研究结果,鉴于纳米球和纳米囊在渗透性方面没有差异,Calvo 等也排除了油性内部结构对纳米囊活性的影

响^[132]。此外,Calvo 等用吡啶美辛纳米囊证明了载体的胶体性质是影响眼睛生物利用度的主要因素。在纳米囊的物理稳定性和眼睛的生物利用度方面,上述这些作者对纳米囊的性质以及表面电荷的影响同样感兴趣^[133,134]。他们发现在泪液中有带正电荷的酶,用阳离子聚合物包裹在带负电荷的聚 ϵ -己内酯纳米囊表面能够防止溶菌酶的吸附而引起降解。此外,他们注意到与其他带正电荷的聚合物相比,吸附在纳米囊表面的阳离子聚合物壳聚糖具有最佳的角膜药物渗透性而不产生任何局部过敏反应。这是综合以下三种作用实现的:颗粒进入角膜上皮细胞的渗透性、带正电荷的颗粒在带负电荷膜上的黏膜黏附性,以及对紧密连接的特殊作用^[134]。

Calvo 等报道了用免疫抑制剂环孢素提高眼睛吸收的效果。与药物的油性溶液相比,角膜的药物浓度增大了 5 倍,这是由于纳米囊制剂的载药量高,其中包括聚 ϵ -己内酯。用大鼠穿透性角膜移植免疫排斥模型来评价局部使用制剂的功效^[136]。根据分散在聚丙烯酸凝胶中的聚丙烯酸烷基酯能显著降低聚丙烯酸烷基酯对角膜的毒性以及能促进药物的吸收,Le Burlais 等提出环孢素纳米囊^[137]。

参考文献

1. Scheffel, U.; Rhodes, B. A.; Natarajan, T. K.; Wagner, H. N. Albumin Microspheres for the Study of the Reticulo-Endothelial System. *J. Nucl. Med.* 1972, 13, 498-503.
2. Marty, J. J.; Oppenheim, R. C.; Speiser, P. Nanoparticles: A New Colloidal Drug Delivery Systems. *Pharm. Acta Helv.* 1978, 53, 17-23.
3. Birrenbach, G.; Speiser, P. Polymerized Micelles and their use as Adjuvants in Immunology. *J. Pharm. Sci.* 1976, 65, 1763-1766.
4. Kreuter, J.; Speiser, P. New Adjuvants on a Poly (methylmethacrylate) Base. *Infect. Immunol.* 1976, 13, 204-210.
5. Couvreur, P.; Kante, B.; Roland, M.; Guiot, P.; Baudhuin, P.; Speiser, P. Poly (cyanoacrylate) Nanoparticles as Potential Lysosomotropic Carriers; Preparation. Morphological and Sorptive Properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 1979, 31, 331-332.
6. Gurny, R.; Peppas, N. A.; Harrington, D. D.; Banker, G. S. Development of Biodegradable and Injectable Lattices for Controlled Release Potent Drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1981, 7, 1-25.
7. Al Khoury-Fallouh, N.; Roblot-Treupel, L.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P.; Puisieux, F. Development of a New Process for the Manufacture of Poly (isobutylcyanoacrylate) Nanocapsules. *Int. J. Pharm.* 1986, 28, 125-136.
8. Fessi, H.; Devissaguet, J. P.; Puisieux, F. Procédé De Préparation Des Systèmes Colloïdaux Dispersibles Sous Forme De Nanocapsules, French Patent 86. 18. 444, 1986.



9. Legrand, P.; Barratt, G.; Mosqueira, V.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P. Polymeric Nanocapsules as Drug Delivery Systems: A Review. *S. T. P. Pharma Sci.* 1999, 9, 411–418.
10. Fessi, H.; Devissaguet, J. P.; Puisieux, F. Procédé De Préparation De Systèmes Colloïdaux Dispersibles D'une Substance Sous Forme De Nanoparticules, French Patent 2. 608. 988, 1986.
11. Gasco, M.; Trotta, M. Nanoparticles from Microemulsions. *Int. J. Pharm.* 1986, 29, 267–268.
12. Alléman, E.; Doelker, E.; Gurny, R. Preparation of Aqueous Polymeric Nanodispersions by a Reversible Salting-Out Process, Influence of Process Parameters on Particle Size. *Int. J. Pharm.* 1992, 87, 247–253.
13. Quintanar-Guerrero, D.; Alléman, E.; Doelker, E.; Fessi, H. Preparation and Characterization of Nanocapsules from Preformed Polymers by a New Process Based on Emulsification-Diffusion Technique. *Pharm. Res.* 1998, 15, 1056–1062.
14. Quintanar-Guerrero, D.; Alléman, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Pseudolatex Preparation Using a Novel Emulsion-Diffusion Process Involving Direct Displacement of Partially Water-Miscible Solvents by Distillation. *Int. J. Pharm.* 1999, 188, 155–164.
15. Zambaux, M. F.; Bonneauz, F.; Gref, R.; Maincent, P.; Dellacherie, E.; Alonso, M. J.; Labrude, P.; Vigneron, C. Influence of Experimental Parameters on the Characteristics of Poly (lactic acid) Nanoparticles Prepared by a Double Emulsion Method. *J. Controlled. Release* 1998, 50, 31–40.
16. Vauthier, C.; Couvreur, P. Development of Polysaccharide Nanoparticles as Novel Drug Carrier Systems. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*; Wise, Trantolo, Cichon, Inyang, Stottmeister, Eds.; Chap. 21, Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 413–429.
17. Gref, R.; Minamitake, Y.; Peracchia, M. T.; Domb, A.; Trubetskoy, V.; Torchilin, V.; Langer, R. Poly (ethylene Glycol)-Coated Nanospheres: Potential Carriers for Intravenous Drug Administration. *Pharm. Biotechnol.* 1997, 10, 167–198.
18. Vauthier-Holtzschler, C.; Benabbou, S.; Spenlehauer, G.; Veillard, M.; Couvreur, P. Methodology for the Preparation of Ultradispersed Polymer Systems. *S. T. P. Pharma Sci.* 1991, 1, 109–116.
19. Kreuter, J. Nanoparticles. *Colloidal Drug Delivery Systems*; Kreuter, J., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1994; 219–342.
20. Quintanar-Guerrero, D.; Alléman, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1998, 24, 1113–1128.
21. De Jaeghere, F.; et al. Nanoparticles. *The Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*; Mathiowitz, E., Ed.; Wiley and Sons, Inc.: New York, 1999; 641–664.
22. Lowell, P. A.; El-Aasser, M. S. Eds.; *Emulsion Polymerization and Emulsion Polymers*, Wiley: New York, 1997; 801.
23. Seijo, B.; Fattal, E.; Roblot-Treupel, L.; Couvreur, P. Design of Nanoparticles of Less than 50 nm in Diameter. Preparation, Characterization and Drug Loading. *Int. J. Pharm.* 1990, 62, 1–7.
24. Peracchia, M. T.; Vauthier, C.; Popa, M.; Puisieux, F.; Couvreur, P. Investigation of the Formation of Sterically Stabilized Poly (ethyleneglycol/isobutylcyanoacrylate) Nanoparticles by Chemical Grafting of Poly (ethylene glycol) During Polymerization of Isobutylcyanoacrylate. *S. T. P. Pharma Sci.* 1997, 7, 513–520.
25. De Keyser, J. L.; Poupaert, J. H.; Dumont, P. Poly (diethyl methylidenemalonate) Nanoparticles as a Potential Drug Carrier; Preparation, Distribution and Elimination After Intravenous and Peroral Administration to Mice. *J. Pharm. Sci.* 1991, 80, 67–70.
26. Gallardo, M. M.; Couarraze, G.; Denizot, B.; Treupel, L.; Couvreur, P.; Puisieux, F. Preparation and Purification of Isohexylcyanoacrylate Nanocapsules. *Int. J. Pharm.* 1993, 100, 55–64.
27. Aboubakar, M.; Puisieux, F.; Couvreur, P.; Deyme, M.; Vauthier, C. Study of the Mechanism of Insulin Encapsulation in Poly (isobutylcyanoacrylate) Nanocapsules Obtained by Interfacial Polymerization. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999, 47, 568–576.
28. Watnasirichaikul, S.; Rades, R.; Tucker, I. G.; Davies, N. M. Manipulating the Release of Insulin from Nanocapsules Prepared by Interfacial Polymerization of Microemulsions, Proceedings of the 27th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials of the Controlled Release Society, Inc.: Paris France July 9–13 2000, Abstract # 6138.
29. Lambert, G.; Fattal, E.; Pinto-Alphandary, H.; Gulik, A.; Couvreur, P. Polyisobutylcyanoacrylate Nanocapsules Containing an Aqueous Core as a Novel Colloidal Carrier for the Delivery of Oligonucleotides. *Biochimie* 1998, 80, 969–976.
30. De Miguel, I.; Ioualalen, K.; Bonnefous, M.; Peyrot, M.; Nguyen, F.; Cervilla, M.; Soulet, N.; Dirson, R.; Rieumajou, V.; Imbertie, L.; Solers, C.; Cazes, S.;

- Favre, G.; Samain, D. Synthesis and Characterization of Supramolecular Biovector (SMBV) Specifically Designed for the Entrapment of Ionic Molecules. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995, 1237, 49–58.
31. Stainmesse, S. Etude galénique D'un Nouveau Procédé D'obtention De Vecteurs Colloïdaux Submicroniques à Partir D'une Protéine Ou D'un Polymère Synthétique; Thesis Université De Paris Sud, 1990.
32. Weber, C.; Coester, C.; Kreuter, J.; Langer, K. Desolvation Process and Surface Characterization of Protein Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2000, 194, 94–102.
33. Leong, K. W.; Mao, H. Q.; Truong-Le, V. L.; Roy, K.; Walsh, S. M.; August, J. T. DNA-Polycation Nanospheres as Non-Viral Gene Delivery Vehicles. *J. Control. Rel.* 1998, 53, 183–193.
34. Truong-Le, V. L.; Walsh, S. M.; Schweibert, E.; Mao, H. Q.; Guggino, W. B.; August, J. T.; Leong, K. W. Gene Transfer by DNA-Gelatin Nanospheres. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999, 361, 47–56.
35. Rajaonarivony, M.; Vauthier, C.; Couarraze, G.; Puisieux, F.; Couvreur, P. Development of a New Drug Carrier Made from Alginate. *J. Pharm. Sci.* 1993, 82, 912–918.
36. Calvo, P.; Remunan-Lopez, C.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* 1997, 63, 125–132.
37. Vanderhoff, J. W.; El-Aasser, M. S.; Ugelstad, J. Polymer Emulsification Process, U. S. Patent 4. 177. 177, 1979.
38. Illum, L.; Davis, S. S. The Organ Uptake of Intravenously Administered Colloidal Particles can be Altered Using Non-Ionic Surfactant (Poloxamer 338). *FEBS Let.* 1984, 167, 79–82.
39. Gref, R.; Minamitake, Y.; Peracchia, M. T.; Trubetskoy, V.; Torchilin, V.; Langer, R. Biodegradable Long-Circulating Nanospheres. *Science* 1994, 263, 1600–1603.
40. Peracchia, M. T.; Desmaële, D.; Couvreur, P.; D'Angelo, J. Synthesis of a Novel Poly (PEG-Cyanoacrylate-co-Alkylcyanoacrylate) Amphiphilic Copolymer for the Development of "Stealth" PEG-Coated Nanoparticles. *Macromolecules* 1997, 30, 846–851.
41. Peracchia, M. T.; Desmaële, D.; Vauthier, C.; Labarre, D.; Fattal, E.; D'Angelo, J.; Couvreur, P. Development of Novel Technologies for the Synthesis of Biodegradable Pegylated Nanoparticles. Targeting of Drugs 6; Strategies for Stealth Therapeutic Systems; Gregoriadis, B., McCormack, B., Eds.; Plenum Press: New York, 1998; 225–239.
42. Passirani, C.; Ferrarini, L.; Barratt, G.; Devissaguet, J. P.; Labarre, D. Preparation and Characterization of Nanoparticles Bearing Heparin or Dextran Covalently-Linked to Poly (methylmethacrylate). *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*; 1999, 10, 47–62.
43. Stella, B.; Arpicco, S.; Peracchia, M. T.; Desmaële, D.; Hoebeke, J.; Renoir, M.; D'Angelo, J.; Cattel, L.; Couvreur, P. Characterization of Folic Acid-nanoparticles Conjugates for Tumoral Targeting Proceedings of the 27th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials of the Controlled Release Society, Inc.; Paris France July 9–13, 2000; Abstract # 6307
44. Kawashima, Y.; Yamamoto, H.; Takeuchi, H.; Kuno, Y. Mucoadhesive DL-Lactide/Glycolide Copolymer Nanospheres Coated with Chitosan to Improve Oral Delivery of Elcatonin. *Pharm. Dev. Technol.* 2000, 5, 77–85.
45. Candau, F.; Ottewill, R. H., Eds.; An Introduction to Polymer Colloids; Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, The Netherlands, 1989; 240.
46. Giddings, J. C. Field-Flow Fractionation: Analysis of Macromolecular, Colloidal and Particular Materials. *Science* 1993, 260, 1456–1465.
47. Anger, S.; Caldwell, K.; Niehus, H.; Muller, R. H. High Resolution Size Determination of 20 nm Colloidal Gold Particles by SedFFF. *Pharm. Res.* 1999, 16, 1743–1747.
48. Tan, J. S.; Butterfield, D. E.; Voycheck, C. L.; Caldwell, K. D.; Li, J. T. Surface Modification of Nanoparticles by PEO/PPO Block Copolymers to Minimize Interactions with Blood Components and Prolong Blood Circulation in Rats. *Biomaterials* 1993, 14, 823–833.
49. Huve, P.; Verrecchia, T.; Bazile, D.; Vauthier, C.; Couvreur, P. Simultaneous Use of Size Exclusion Chromatography and Photon Correlation Spectroscopy for Poly (lactic Acid) Nanoparticle Characterization. *Chromatographia* 1994, 675, 129–139.
50. Barratt, G. Characterization of Colloidal Drug Carrier Systems with Zeta Potential Measurements. *Pharmaceutical Technology Europe* 1999, 25–32.
51. Cartensen, H.; Muller, B. W.; Muller, R. H. Adsorption of Ethoxylated Surfactants on Nanoparticles. I. Characterization by Hydrophobic Interaction Chromatography. *Int. J. Pharm.* 1991, 67, 29–37.
52. Blunk, T.; Hochstrasser, D. F.; Sanchez, J. C.; Muller, B. W.; Muller, R. H. Colloidal Carriers for IV Drug Targeting; Plasma Protein Adsorption Patterns on Surface Modified Latex Particles Evaluated by Two-Dimen-



- sional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Electrophoresis* 1993, 14, 1382—1387.
53. Olivier, J. C.; Vauthier, C.; Taverna, M.; Puisieux, F.; Ferrier, D.; Couvreur, P. Stability of Orosomucoid-Coated Poly (isobutylcyanoacrylate) Nanoparticles in the Presence of Serum. *J. Controlled Release* 1996, 40, 157—168.
54. Vittaz, M.; Bazile, D.; Spenlehauer, G.; Verrecchia, T.; Veillard, M.; Puisieux, F.; Couvreur, P. Effect of PEO Surface Density on Long Circulating PLA-PEO Nano-Particles which Are Very Low Complement Activators. *Biomaterials* 1996, 17, 1575—1581.
55. Passirani, C.; Barratt, G.; Devissaguet, J. P.; Labarre, D. Interactions of Nanoparticles Bearing Heparin or Dextran Covalently Bound to Poly (methylmethacrylate) with the Complement System. *Life Sci.* 1998, 62, 775—785.
56. Irache, J.; Durrer, C.; Ponchel, G.; Duchene, D. Determination of Nanoparticle Concentration in Latexes by Turbidimetry. *Int. J. Pharm.* 1993, 90, R9—R12.
57. Kreuter, J. Physico-Chemical Characterization of Polyacrylic Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 1983, 14, 43—58.
58. Vauthier, C.; Schmidt, C.; Couvreur, P. Measurement of the Density of Polymeric Nanoparticulate Drug Carriers Made of Poly (alkylcyanoacrylate) and Poly (lactic Acid) Derivatives. *J. Nanoparticle Res.* 1999, 1, 411—418.
59. Fattal, E.; Rojas, J.; Youssef, M.; Couvreur, P.; Andreumont, A. Liposome-Entrapped Ampicillin in the Treatment of Experimental Murine Listeriosis and Salmonellosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1991, 35, 770—772.
60. Grislain, L.; Couvreur, P.; Lenaerts, V.; Roland, M.; Deprez-Decampeneere, D.; Speiser, P. Pharmacokinetics and Distribution of a Biodegradable Drug-Carrier. *Int. J. Pharm.* 1983, 15, 335—345.
61. Lenaerts, V.; Nagelkerke, J. F.; Van Berkel, T. J.; Couvreur, P.; Grislain, L.; Roland, M.; Speiser, P. In Vivo Uptake of Polyisobutyl Cyanoacrylate Nanoparticles by Rat Liver Kupffer, Endothelial, and Parenchymal Cells. *J. Pharm. Sci.* 1984, 73, 980—982.
62. Lenaerts, V.; Couvreur, P.; Christiaens-Leyh, D.; Joiris, E.; Roland, M.; Rollman, B.; Speiser, P. Degradation of Poly (Isobutyl cyanoacrylate) Nanoparticles. *Biomaterials* 1984, 5, 65—68.
63. Chavany, C.; Ledoan, T.; Couvreur, P.; Puisieux, F.; Helene, C. Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles as Polymeric Carriers for Antisense Oligonucleotides. *Pharm. Res.* 1992, 9, 441—449.
64. Peracchia, M. T.; Fattal, E.; Desmaele, D.; Besnard, M.; Noel, J. P.; Gomis, J. M.; Appel, M.; d'Angelo, J.; Couvreur, P. Stealth PEGylated Polycyanoacrylate Nanoparticles for Intravenous Administration and Splenic Targeting. *J. Controlled Release* 1999, 60, 121—128.
65. Bazile, D.; Prud'homme, C.; Bassoullet, M. T.; Marlard, M.; Spenlehauer, G.; Veillard, M. Stealth Me. PEG-PLA Nanoparticles Avoid Uptake by the Mononuclear Phagocytes System. *J. Pharm. Sci.* 1995, 84, 493—498.
66. Fattal, E.; Youssef, M.; Couvreur, P.; Andreumont, A. Treatment of Experimental Salmonellosis in Mice with Ampicillin-Bound Nanoparticles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989, 33, 1540—1543.
67. Youssef, M.; Fattal, E.; Alonso, M. J.; Roblot-Treupel, L.; Sauzieres, J.; Tancrede, C.; Omnes, A.; Couvreur, P.; Andreumont, A. Effectiveness of Nanoparticle-Bound Ampicillin in the Treatment of *Listeria Monocytogenes* Infection in Athymic Nude Mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988, 32, 1204—1207.
68. Forestier, F.; Gerrier, P.; Chaumard, C.; Quero, A. M.; Couvreur, P.; Labarre, C. Effect of Nanoparticle-Bound Ampicillin on the Survival of *Listeria Monocytogenes* in Mouse Peritoneal Macrophages. *J. Antimicrob. Chemother.* 1992, 30, 173—179.
69. Balland, O.; Pinto-Alphandary, H.; Pecquet, S.; Andreumont, A.; Couvreur, P. The Uptake of Ampicillin-Loaded Nanoparticles by Murine Macrophages Infected with *Salmonella Typhimurium*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1994, 33, 509—522.
70. Pinto-Alphandary, H.; Balland, O.; Laurent, M.; Andreumont, A.; Puisieux, F.; Couvreur, P. Intracellular Visualization of Ampicillin-Loaded Nanoparticles in Peritoneal Macrophages Infected in Vitro with *Salmonella Typhimurium*. *Pharm. Res.* 1994, 11, 38—46.
71. Buchmeier, N. A.; Heffron, F. Inhibition of Macrophage Phagosome-Lysosome Fusion by *Salmonella Typhimurium*. *Infect. Immun.* 1991, 59, 2232—2238.
72. Page-Clisson, M. E.; Pinto-Alphandary, H.; Chachaty, E.; Couvreur, P.; Andreumont, A. Drug Targeting by Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles is Not Efficient Against Persistent *Salmonella*. *Pharm. Res.* 1998, 15, 544—549.
73. Gaspar, R.; Oppendoes, F. R.; Preat, V.; Roland, M. Drug Targeting with Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles - In Vitro Activity of Primaquine-Loaded Nanoparticles Against Intracellular *Leishmania-Donovani*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1992, 86, 41—49.
74. Gaspar, R.; Preat, V.; Oppendoes, F. R.; Roland, M.

- Macrophage Activation by Polymeric Nanoparticles of Polyalkylcyanoacrylates: Activity Against Intracellular Leishmania Donovanii Associated with Hydrogen Peroxide Production. *Pharm. Res.* 1992, 9, 782–787.
75. Fouarge, M.; Dewulf, M.; Couvreur, P.; Roland, M.; Vranckx, H. Development of Dehydroemetine Nanoparticles for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *J. Microencapsul.* 1989, 6, 29–34.
 76. Brasseur, F.; Verdun, C.; Couvreur, P.; Deckers, C.; Roland, M. Evaluation Expérimentale De L'efficacité Thérapeutique De La Doxorubicine Associée Aux Nanoparticules De Polyalkylcyanoacrylate. *Proceedings of the 4th International Conference on Pharmaceutical Technology*, Paris, France, June, 3–5, 1986; 177–186.
 77. Chiannilkulchai, N.; Driouch, Z.; Benoit, J. P.; Parodi, A. L.; Couvreur, P. Doxorubicin-loaded Nanoparticles: Increased Efficiency in Murine Hepatic Metastases. *Sel. Cancer Ther.* 1989, 5, 1–11.
 78. Chiannilkulchai, N.; Ammoury, N.; Caillou, B.; Devisaguet, J. P.; Couvreur, P. Hepatic Tissue Distribution of Doxorubicin-Loaded Nanoparticles After I. V. Administration in Reticulosarcoma M 5076 Metastasis-Bearing Mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1990, 26, 122–126.
 79. Couvreur, P.; Grislain, L.; Lenaerts, V.; Brasseur, F.; Guiot, P.; Biornacki, A. Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Carrier for Antitumor Agents. *Polymeric Nanoparticles and Microparticles*; Guiot, P., Couvreur, P., Eds.; CRC Press, Inc.: Boca Raton, FL, 1986; 27–93.
 80. Daemen, T.; Hofstede, G.; Ten Kate, M. T.; Bakker-Woudenberg, I. A.; Scherphof, G. L. Liposomal Doxorubicin-Induced Toxicity: Depletion and Impairment of Phagocytic Activity of Liver Macrophages. *Int. J. Cancer.* 1995, 61, 716–721.
 81. Fernandez-Urrusuno, R.; Fattal, E.; Porquet, D.; Feger, J.; Couvreur, P. Evaluation of Liver Toxicological Effects Induced by Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1995, 130, 272–279.
 82. Fernandez-Urrusuno, R.; Fattal, E.; Rodrigues, J. M., Jr.; Feger, J.; Bedossa, P.; Couvreur, P. Effect of Polymeric Nanoparticle Administration on the Clearance Activity of the Mononuclear Phagocyte System in Mice. *J. Biomed. Mater. Res.* 1996, 31, 401–408.
 83. Gibaud, S.; Andreux, J. P.; Weingarten, C.; Renard, M.; Couvreur, P. Increased Bone Marrow Toxicity of Doxorubicin Bound to Nanoparticles. *Eur. J. Cancer* 1994, 6, 820–826.
 84. Gibaud, S.; Rousseau, C.; Weingarten, C.; Favier, R.; Douay, L.; Andreux, J. P.; Couvreur, P. Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles as Carriers for Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF). *J. Controlled Release* 1998, 52, 131–139.
 85. Demoy, M.; Gibaud, S.; Andreux, J. P.; Weingarten, C.; Gouritin, B.; Couvreur, P. Splenic Trapping of Nanoparticles: Complementary Approaches for In Situ Studies. *Pharm. Res.* 1997, 14, 463–468.
 86. Verdun, C.; Brasseur, F.; Vranckx, H.; Couvreur, P.; Roland, M. Tissue Distribution of Doxorubicin Associated with PIHCA Nanoparticles. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1990, 26, 13–18.
 87. Kartner, N.; Evernden-Porelle, D.; Bradley, G.; Ling, V. Detection of P-glycoprotein in Multidrug-Resistant Cell Lines by Monoclonal Antibodies. *Nature* 1985, 316, 820–823.
 88. Brasseur, F.; Couvreur, P.; Kante, B.; Deckers-Passau, L.; Roland, M.; Deckers, C.; Speiser, P. Actinomycin D Absorbed on Polymethylcyanoacrylate Nanoparticles: Increased Efficiency Against an Experimental Tumor. *Eur. J. Cancer* 1980, 16, 1441–1445.
 89. Treupel, L.; Poupon, M. F.; Couvreur, P.; Puisieux, F. Vectorisation of Doxorubicin in Nanospheres and Reversion of Pleiotropic Resistance of Tumor Cells. *C. R. Acad. Sci. III* 1991, 313, 171–174.
 90. Cuvier, C.; Roblot-Treupel, L.; Millot, J. M.; Lizard, G.; Chevillard, S.; Manfait, M.; Couvreur, P.; Poupon, M. F. Doxorubicin-Loaded Nanospheres Bypass Tumor Cell Multidrug Resistance. *Biochem. Pharmacol.* 1992, 44, 509–517.
 91. Bennis, S.; Chapey, C.; Couvreur, P.; Robert, J. Enhanced Cytotoxicity of Doxorubicin Encapsulated in Polyisohexylcyanoacrylate Nanospheres Against Multidrug-Resistant Tumour Cells in Culture. *Eur. J. Cancer* 1994, 1, 89–93.
 92. Nemati, F.; Dubernet, C.; Colin de Verdière, A.; Poupon, M. F.; Treupel, L.; Puisieux, F.; Couvreur, P. Some Parameters Influencing Cytotoxicity of Free Doxorubicin Loaded Nanoparticles in Sensitive and Multidrug Resistant Leukemic Murine Cells: Incubation Time, Number of Particles Per Cell. *Int. J. Pharm.* 1994, 102, 55–62.
 93. Colin de Verdière, A.; Dubernet, C.; Nemati, F.; Poupon, M. F.; Puisieux, F.; Couvreur, P. Uptake of Doxorubicin from Loaded Nanoparticles in Multidrug-Resistant Leukemic Murine Cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1994, 33, 504–508.
 94. Colin de Verdière, A. C.; Dubernet, C.; Nemati, F.; Soma, E.; Appel, M.; Ferte, J.; Bernard, S.; Puisieux,



- F.; Couvreur, P. Reversion of Multidrug Resistance with Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles: Towards a Mechanism of Action. *Br. J. Cancer* 1997, 76, 198—205.
95. Soma, C. E.; Dubernet, C.; Barratt, G.; Nemati, F.; Appel, M.; Benita, S.; Couvreur, P. Ability of Doxorubicin-Loaded Nanoparticles to Overcome Multidrug Resistance of Tumor Cells After Their Capture by Macrophages. *Pharm. Res.* 1999, 16, 1710—1716.
96. al Khouri, N.; Fessi, H.; Roblot-Treupel, L.; Devissaguet, J. P.; Puisieux, F. An Original Procedure for Preparing Nanocapsules of Polyalkylcyanoacrylates for Interfacial Polymerization. *Pharm. Acta Helv.* 1986, 61, 274—281.
97. Morin, C.; Barratt, G.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P.; Puisieux, F. Improved Intracellular Delivery of a Muramyl Dipeptide Analog by Means of Nanocapsules. *Int. J. Immunopharmacol.* 1994, 16, 451—456.
98. Seyler, I.; Appel, M.; Devissaguet, J. P.; Legrand, P.; Barratt, G. Relationship Between NO-Synthase Activity and TNF-Alpha Secretion in Mouse Macrophage Lines Stimulated by a Muramyl Peptide Entrapped in Nanocapsules. *Int. J. Immunopharmacol.* 1996, 18, 385—392.
99. Seyler, I.; Appel, M.; Devissaguet, J. P.; Legrand, P.; Barratt, G. Macrophage Activation by a Lipophilic Derivative of Muramyl dipeptide. *J. Nanoparticle Res.* 1999, 1, 91—97.
100. Barratt, G.; Puisieux, F.; Yu, W. P.; Foucher, C.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P. Anti-Metastatic Activity of MDP-L-Alanyl-Cholesterol Incorporated into Various Types of Nanocapsules. *Int. J. Immunopharmacol.* 1994, 16, 457—461.
101. Fattal, E.; Vauthier, C.; Aynie, I.; Nakada, Y.; Lambert, G.; Malvy, C.; Couvreur, P. Biodegradable Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles for the Delivery of Oligonucleotides. *J. Controlled. Rel.* 1998, 53, 137—143.
102. Chavany, C.; Saison-Behmoaras, T.; Le Doan, T.; Puisieux, F.; Couvreur, P.; Helene, C. Adsorption of Oligonucleotides Onto Polyisohexylcyanoacrylate Nanoparticles Protects them Against Nucleases and Increases Their Cellular Uptake. *Pharm. Res.* 1994, 11, 1370—1378.
103. Nakada, Y.; Fattal, E.; Foulquier, M.; Couvreur, P. Pharmacokinetics and Biodistribution of Oligonucleotide Adsorbed onto Poly (isobutylcyanoacrylate) Nanoparticles After Intravenous Administration in Mice. *Pharm. Res.* 1996, 13, 38—43.
104. Schwab, G.; Duroux, I.; Chavany, C.; Helene, C.; Saison-Behmoaras, E. An Approach for New Anticancer Drugs: Oncogene-Targeted Antisense DNA. *Ann. Oncol.* 1994, 5, 55—58.
105. Lambert, G.; Fattal, E.; Brehier, A.; Feger, J.; Couvreur, P. Effect of Polyisobutylcyanoacrylate Nanoparticles and Lipofectin Loaded with Oligonucleotides on Cell Viability and PKCa Neosynthesis in HepG2 Cells. *Biochimie*, in press.
106. Aynie, I.; Vauthier, C.; Chacun, H.; Fattal, E.; Couvreur, P. Spongelike Alginate Nanoparticles as a New Potential System for the Delivery of Antisense Oligonucleotides. *Antisense. Nucleic Acid Drug Dev.* 1999, 9, 301—312.
107. Gautier, J. C.; Grangier, J. L.; Barbier, A.; Dupont, P.; Dussosoy, D.; Pastor, G.; Couvreur, P. Biodegradable Nanoparticles for Subcutaneous Administration of Growth Hormone Releasing Factor (hGRF) . *J. Controlled. Rel.* 1992, 3, 205—210.
108. Kreuter, J.; Speiser, P. P. In Vitro Studies of Poly (methyl methacrylate) Adjuvants. *J. Pharm. Sci.* 1976, 65, 1624—1627.
109. Kreuter, J. Possibilities of Using Nanoparticles as Carriers for Drugs and Vaccines. *J. Microencapsul* 1988, 5, 115—127.
110. Kreuter, J.; Liehl, E. Long-Term Studies of Microencapsulated and Adsorbed Influenza Vaccine Nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 1981, 70, 367—371.
111. Kreuter, J.; Haenzel, I. Mode of Action of Immunological Adjuvants: Some Physicochemical Factors Influencing the Effectivity of Polyacrylic Adjuvants. *Infect Immun* 1978, 19, 667—675.
112. Kreuter, J.; Berg, U.; Liehl, E.; Soliva, M.; Speiser, P. P. Influence of the Particle Size on the Adjuvant Effect of Particulate Polymeric Adjuvants. *Vaccine* 1986, 4, 125—129.
113. Kreuter, J.; Liehl, E.; Berg, U.; Soliva, M.; Speiser, P. P. Influence of Hydrophobicity on the Adjuvant Effect of Particulate Polymeric Adjuvants. *Vaccine* 1988, 6, 253—256.
114. Jani, P.; Halbert, G. W.; Langridge, J.; Florence, A. T. The Uptake and Translocation of Latex Nanospheres and Microspheres After Oral Administration to Rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 1989, 41, 809—812.
115. Le Fevre, H. E.; Joel, D. D.; Shidlousky, G. Retention of Ingested Latex Particles in Peyer's Patches of Gerinfree and Conventional Mice. *Soc. Exp. Biol. Med.* 1985, 179, 522—528.
116. Dange, C.; Michel, C.; Aprahamian, M.; Couvreur, P.; Devissaguet, J. P. Nanocapsules as Carriers for Oral Peptide Delivery. *J. Control. Rel.* 1990, 13,

- 233—239.
117. Kreuter, J.; Muller, V.; Munz, K. Quantitative and Microautoradiographic Study on Mouse Intestinal Distribution of Polycyanoacrylate Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 1989, 55, 39—45.
118. Aprahamian, M.; Michel, C.; Humbert, W.; Devissaguet, J. P.; Damge, C. Transmucosal Passage of Polyalkylcyanoacrylate Nanocapsules as a New Drug Carrier in the Small Intestine. *Biol. Cell* 1987, 61, 69—76.
119. Damge, C.; Michel, C.; Aprahamian, M.; Couvreur, P. New Approach for Oral Administration of Insulin with Polyalkylcyanoacrylate Nanocapsules as Drug Carrier. *Diabetes* 1988, 37, 246—251.
120. Lowe, P. J.; Temple, C. S. Calcitonin and Insulin in Isobutylcyanoacrylate Nanocapsules; Protection Against Proteases and Effect on Intestinal Absorption in Rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994, 46, 547—552.
121. Aboubakar, M.; Puisieux, F.; Couvreur, P.; Vauthier, C. Physico-Chemical Characterization of Insulin-Loaded Poly (isobutylcyanoacrylate) Nanocapsules Obtained by Interfacial Polymerization. *Int. J. Pharm.* 1999, 183, 63—66.
122. Michel, C.; Aprahamian, M.; Defontaine, L.; Couvreur, P.; Damge, C. The Effect of Site of Administration in the Gastrointestinal Tract on the Absorption of Insulin from Nanocapsules in Diabetic Rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 1991, 43, 1—5.
123. Aboubakar, M.; Couvreur, P.; Pinto-Alphandary, H.; Gouritin, B.; Lacour, B.; Farinotti, R.; Puisieux, F.; Vauthier, C. Insulin-Loaded Nanocapsules for Oral Administration; In Vitro and In Vivo Investigation. *Drug Del. Res.* 2000, 49, 109—117.
124. Damge, C.; Vranckx, H.; Balschmidt, P.; Couvreur, P. Poly (alkyl cyanoacrylate) Nanospheres for Oral Administration of Insulin. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86, 1403—1409.
125. Damge, C.; Vonderscher, J.; Marbach, P.; Pinget, M. Poly (alkyl cyanoacrylate) Nanocapsules as a Delivery System in the Rat for Octreotide, A Long-Acting Somatostatin Analogue. *J. Pharm. Pharmacol.* 1997, 49, 949—954.
126. O'Hagan, D. T.; Palin, K.; Davis, S. S. Poly (butylcyanoacrylate) Particles as Adjuvant for Oral Immunization. *Vaccine* 1989, 7, 213—216.
127. Marchal-Heussler, L.; Sirbat, D.; Hoffman, M.; Maincent, P. Poly (epsilon-caprolactone) Nanocapsules in Carteolol Ophthalmic Delivery. *Pharm. Res.* 1993, 10, 386—390.
128. Marchal-Heussler, L.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P.; Hoffman, M.; Maincent, P. Colloidal Drug Delivery Systems for the Eye. A Comparison of the Efficacy of Three Different Polymers: Polyisobutylcyanoacrylate, Poly (lactic-co-glycolic Acid), Poly-Epsilon Caprolactone. *S. T. P. Pharma* 1992, 2, 98—104.
129. Losa, C.; Marchal-Heussler, L.; Orallo, F.; Vila Jato, J. L.; Alonso, M. J. Design of New Formulations for Topical Ocular Administration: Polymeric Nanocapsules Containing Metipranolol. *Pharm. Res.* 1993, 10, 80—87.
130. Calvo, P.; Thomas, C.; Alonso, M. J.; Vila Jato, J. L.; Robinson, J. R. Study of the Mechanism of Interaction of Poly (epsilon caprolactone) Nanocapsules with the Cornea by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Int. J. Pharm.* 1994, 103, 283—291.
131. Zimmer, A.; Kreuter, J.; Robinson, J. R. Studies on the Transport Pathway of PBCA Nanoparticles in Ocular Tissues. *J. Microencapsul* 1991, 8, 497—504.
132. Calvo, P.; Alonso, M. J.; Vila-Jato, J. L.; Robinson, J. R. Improved Ocular Bioavailability of Indomethacin by Novel Ocular Drug Carriers. *J. Pharm. Pharmacol.* 1996, 48, 1147—1152.
133. Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. Effect of Lysozyme on the Stability of Polyester Nanocapsules and Nanoparticles; Stabilization Approaches. *Biomaterials* 1997, 18, 1305—1310.
134. Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. Evaluation of Cationic Polymer-Coated Nanocapsules as Ocular Drug Carriers. *Int. J. Pharm.* 1997, 153, 41—50.
135. Calvo, P.; Sanchez, A.; Martinez, J.; Lopez, M. I.; Calonge, M.; Pastor, J. C.; Alonso, M. J. Polyester Nanocapsules as New Topical Ocular Delivery Systems for Cyclosporin. *A. Pharm. Res.* 1996, 13, 311—315.
136. Juberias, J. R.; Calonge, M.; Gomez, S.; Lopez, M. I.; Calvo, P.; Herreras, J. M.; Alonso, M. J. Efficacy of Topical Cyclosporine-Loaded Nanocapsules on Keratoplasty Rejection in the Rat. *Curr. Eye Res.* 1998, 17, 39—46.
137. Le Boulais, C. A.; Chevanne, F.; Turlin, B.; Acar, L.; Zia, H.; Sado, P. A.; Needham, T. E.; Leverge, R. Effect of Cyclosporine a Formulations on Bovine Corneal Absorption; Ex-Vivo Study. *J. Microencapsul* 1997, 14, 457—467.

(栾瀚森 译)

N

凝胶和冻胶

Clyde M. Ofner III

University of the Sciences in Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania, U. S. A.

Cathy M. Klech-Gelotte

McNeil Consumer Healthcare, Fort Washington, Pennsylvania, U. S. A.

引言

“凝胶”(gel)这个单词来源于“明胶”(gelation),“凝胶”(gel)和“冻胶”(jelly)都可追溯到拉丁文“gelu”和“gelare”,意思是“凝固的”或“凝结的”^[1]。这个术语的起源表明了液态到类固态物质的基本特征,即物质不能流动但具有弹性,且保留了液体的一些性质。“凝胶”和“冻胶”之间的区别不很明显,只是在应用方面有所不同。食品工业上使用“明胶冻胶”这个术语,而制药工业上则使用“凝胶”。

术语“凝胶”用于分类起源于19世纪10年代后期,当时,由于缺乏确认物质化学结构的分析方法,所以药剂师们试图根据物质的外观性状而非分子组成来区分半固体物质^[2]。美国药典中^[3]凝胶的定义是:凝胶是由无机小粒子构成的混悬的半固态体系,或者是有机大分子中渗透液体分子的半固态体系。在这样的体系中,如果凝胶是由细小的粒子分散形成的网状结构,这样的凝胶称为两相凝胶;如果凝胶是由有机大分子均匀分布在液相中而形成,且大分子与液相之间无明显界限,这样的凝胶称为单相凝胶。

单相凝胶和冻胶是在适当的液相中加入了大分子物质(如蛋白质、多聚糖和高分子)而构成的一种三维网状结构,在药剂上水和乙醇溶液是最常用的液相。许多聚合物凝胶在凝胶和溶胶这两种状态之间存在可逆性,溶胶为分散或溶解有大分子物质的流动状态,但有些聚合物凝胶由于是由共价键相连生成,故不可逆。两相凝胶和冻胶中的三维网状结构由一些无机黏土构成,这样生成的无机凝胶具有可逆性。

凝胶通常比冻胶更坚固,因为它结构中的共价键更多,物理结合密度更高,或者液相更少。由聚合物构成的凝胶产品其硬度的变化范围大,开始是溶胶,随着硬度增加则变成黏胶、冻胶、凝胶和水凝胶。美国药典收载了23种药物凝胶制剂,3种冻胶制剂及3种不含药物的凝胶,如表1所示。

本章重点讲述以水为基质的凝胶和冻胶。其中,凝胶结构是认识凝胶物理性质的基础,首先进行介绍;其次,讲解凝胶的流变学特征;最后对形成凝胶的天然、半合成、合成聚合物和无机黏土的有关性质,以及它们在药剂领域中的应用进行讨论。

凝胶的微观结构

构成水溶性凝胶的物质通常是一些溶解度大的亲水性聚合物。在一些例子中,在一定的温度和聚合物浓度下加入一定的离子,便形成凝胶的三维结构。尽管聚合物凝胶的化学结构变化各异,主要由液体构成,但它们在较低的外压下仍然是具有弹性的固体。化学组成的差异使凝胶的微观结构存在几种类型,根据Flory提出的方案,人们以其网状微观结构为基础,对药用凝胶进行了大致的分类,如下所示^[2]。

- (1) 聚合物以共价键相连,构成的不规则的网状结构。
- (2) 聚合物以物理键合形成的网状结构,大部分为不规则排列但存在有序片段。
- (3) 由无机黏土构成凝胶中间相的规则片状结构。

表1 美国药典收载的凝胶和冻胶产品

主题	药品或非药品
氢氧化铝凝胶	药品
磷酸铝凝胶	药品
氨苯甲酸凝胶	药品
苯佐卡因、氨苯丁酯和盐酸丁卡因凝胶	药品
苯佐卡因凝胶	药品
过氧化苯甲酰凝胶	药品
苯甲酸倍他米松凝胶	药品
硅凝胶	药品
克林霉素磷酸酯凝胶	药品
去羟米松凝胶	药品
地塞米松凝胶	药品
二甲亚砷凝胶	非药品
盐酸丁卡因凝胶	药品
红霉素和过氧化苯甲酰凝胶	药品
红霉素凝胶	药品
氟氢松凝胶	药品
氢化可的松凝胶	药品
羟丙基纤维素眼用凝胶	药品
盐酸利多卡因凝胶	药品
甲硝唑凝胶	药品
盐酸萘替芬凝胶	药品
去氧肾上腺素鼻用凝胶	药品
多孔硅凝胶	非药品

续表

主题	药品或非药品
盐酸丙吗卡因凝胶	药品
水杨酸凝胶	药品
氟化物和磷酸凝胶	药品
氟化亚锡凝胶	药品
托萘酯凝胶	药品
维生素 A 酸凝胶	药品

1. 共价键结合的网状结构

以共价键连接的凝胶网状结构是不可逆体系, 主要由亲水性聚合物以一种或两种方法制成, Peppas 对此有详细而全面的论述^[4~6]。由于这种凝胶的基质硬度高, 通常称为水凝胶。

在第一种制备方法中, 两个或更多单体非线性共聚, 得到凝胶的网状结构, 这些共聚单体至少有一个具有三维官能团。反应过程中每个聚合物链生长的方向和位置都是任意的, 所以最终形成的凝胶结构是杂乱无序的。两个聚合物单体等摩尔浓度共聚时的凝胶点可以通过改进的 Carothers 方程式^[7]推算出来

$$\bar{X}_n = \frac{2}{(2 - \rho f_{av})}$$

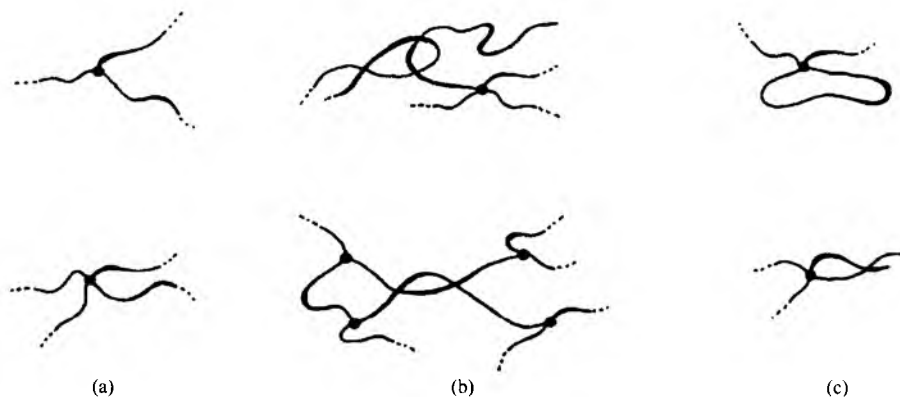


图1 共价键连接的凝胶结构中所存在的化学键合与物理键合。(a) 二官能和三官能的化学键合; (b) 简单的物理缠结; (c) 无效的化学键合和悬空末端

2. 物理键合的网状结构

物理键合的凝胶网状结构具有可逆性, 温度、离子添加剂等因素都能使其结构在溶胶相和凝胶相之间发生转化。这种凝胶主要由天然的有机聚合物(蛋白质和多聚糖)、半合成纤维素衍生物构成, 一些合成的亲水性聚合物所构成的凝胶也属于此类型。

溶胶相中的聚合物链大多以随机的片段存在, 经过构象转变成为凝胶^[11]。这种转变可能是一个或更多聚合链折叠成单螺旋、双螺旋或者三螺旋结构, 继而形成大片规则有序的片段, 然后, 几个规则片段再进行连接, 形成更加规则有序的区域叫做接点区, 这样就构成了凝胶的三维网

式中: \bar{X}_n 表示平均聚合度的数目; ρ 表示转化分数; f_{av} 表示参与反应的聚合单体的平均官能团数。当 $\bar{X}_n \rightarrow \infty$ 时达到凝胶点, 表明胶凝 (ρc) 的临界转化等于 $2/f_{av}$ ^[7]。但实际发生反应时, 胶凝点比方程式中的理论值要少。

化学键合凝胶是另一种制备方法, 它是通过使用低浓度的交联剂, 将单个聚合物的线性或分支的链共价交联^[5]。交联比 X 是交联剂与聚合物重复单元的摩尔之比, 可以表征凝胶三维网状结构的形成。

其他表征交联的参数有膨胀饱和率、交联分子之间的相对分子质量、交联之间的筛孔尺寸以及交联密度^[8]。膨胀饱和率 Q_m 是膨胀聚合物和干聚合物的体积之比, 随交联程度的增加而减小; 交联分子质量 M_c , 由 Flory 方程式得来^[9], 表示膨胀饱和程度, 间接与交联度呈正比; 筛孔尺寸 ζ , 即交联之间的距离, 是交联之间随机的聚合物片段端到端距离的平方根; 交联密度通常由理论公式通过严密的方法测定而得到^[6]。这些模型能辨认出反应时所加入的交联剂数量之间的差异、实际发生的有效化学交联的数量, 同时还能辨认出由化学链缠结而成的物理连接。如果交联位置能够确知, 那么不需要理论模型, 通过化学分析就可以确定交联密度^[10]。由共价键线性连接的凝胶网状结构中, 存在化学键合与物理键合, 其实例见图1。

状结构^[12]。许多接点区分散在网状结构的无定形区域中, 这样就使凝胶具备了机械强度。

物理键合的凝胶其微观结构比无序的化学键合的凝胶更复杂。聚合链在形成接点区时分子的空间排列可能不相同, 而且连接这些接点区的次级分子间作用力也不相同, 所以, 凝胶的物理性质(如硬度、熔点温度和屈服点)与形成的接点区类型有关。一些类型已经得到确定或假定, 在这里进行简要的介绍。

接点区中聚合链的独特组织取决于重复单元的化学结构。举一个例子, 一个多聚糖硫酸盐, 如琼脂和 κ -角叉藻胶, 含有硫酸半乳糖残基, 形成双螺旋结构的接点区; 两个或更多的硫酸盐多聚糖形成多螺旋的接点区^[12]。但是几

个污染残基单元的存在大大降低了聚合物胶凝的能力。这些残基形成扭结, 严重影响到大型键合区中螺旋结构的形

成, 这说明聚合物的空间排列对凝胶的形成很关键^[12]。凝胶的微观结构如图 2 所示。

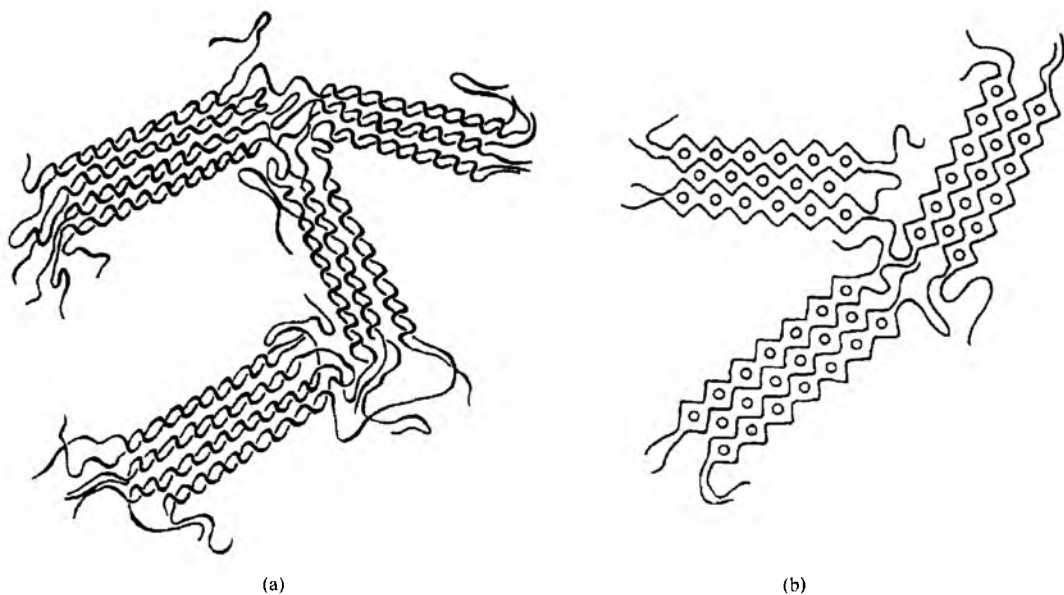


图 2 物理键合的聚合物凝胶中的微观结构。(a) 琼脂凝胶中的多螺旋接点区; (b) 海藻酸钙凝胶中鸡蛋盒模型的接点区

由半合成纤维素衍生物, 如羧甲基纤维素钠 (CMC-Na), 构成的凝胶中含有微晶接点区。在链束形成过程中的残留晶粒能促进纤维素衍生过程。普通的聚合链连接而成交联束, 交联束则进一步连接而成凝胶, 最终凝胶强度取决于交联束分散在溶剂相中的效力^[13]。而且, 存在于立体规则的合成聚合物片段中的微晶区, 能够使凝胶的硬度得到提高, 如聚乙烯醇^[14]。

类胶束接点区由甲基纤维素和聚乙烯聚丙烯嵌段共聚物 (泊洛沙姆) 构成, 尽管聚合物的化学结构不同, 但在它们的分子链中都有疏水区域, 即甲基纤维素和泊洛沙姆的聚丙烯嵌段中存在的二甲基或三甲基-D-葡萄糖残基。这两种聚合物另一个特征是它们的凝胶表现出反向的热可逆性, 即受热胶凝, 冷却熔化。正是这种反向热可逆性行为, 以及聚合物中疏水区域的存在, 证明凝胶中形成了类胶束接点区^[12,15]。在溶胶状态, 随温度升高聚合链中疏水区域的水分子排列变得杂乱无序。暴露的疏水区域互相吸引形成键合, 而亲水区域则进行重排使其与水的接触面积达到最大值。结果, 随温度升高, 类胶束结构继续增大, 数量也继续增加, 最后形成凝胶。

其他的接点区需要多价离子在聚合链之间形成离子架桥。Grant 等^[16]利用鸡蛋盒模型来描述藻酸钙凝胶的形成。在模型中, 羧基基团位于海藻酸的聚葡萄糖醛酸序列中, 钙离子连接于电离的羧基基团之间。钙离子在多聚糖链的规则片段的间隙中 [图 2 (b)] 并列相排。其他有关凝胶中离子架桥的模型机理都大同小异, 但对它的理解却不够准确, 比如认为瓜尔胶只能在硼酸盐的离子中才能形成黏附性

凝胶^[17]。

最后, 一些物理键合的凝胶结构是由一个一个地聚合链简单缠结在一起构成, 并非通过大型的聚集接点区连接。在临界浓度以上, 亲水性聚合物 (如透明质酸和卡波姆) 的长链由于相对分子质量大, 可伸入其他键区域^[18]。随着聚合物浓度增加, 缠结的网状结构也增大最后形成凝胶。与其他物理键合具有规则接点区的凝胶相比, 这种凝胶的排列显得相当杂乱, 但由于其微观结构具有可逆性, 所以值得在这里介绍。但是, 一些研究认为^[12], 凝胶中存在的规则区使凝胶具有一定的硬度, 但这样的规则区域相对分散且不稳定, 所以难以辨别。也有其他的研究认为^[19], 通过与溶剂分子的络合, 链桥之间存在更规则有序的区域。

聚合物片段之间的分子通过各种分子间作用力相连, 比如氢键、范德华力、静电引力及斥力。较高的活化能会使接点区键断裂, 这进一步说明正是各种分子间作用力作用在一起, 才使每个接点区的结构得到维系^[12]。

3. 有序排列的凝胶结构

在适当的条件下, 硅土、氧化铝和黏土的水分散体系形成坚硬的凝胶或水凝胶。蒙脱石之类的黏土 (如膨润土、硅酸铝镁、锂蒙脱石和硅酸镁锂) 一旦接触水, 会自然膨胀断层, 导致水分渗透膨胀形成凝胶^[20]。片状黏土粒子有序连接, 扩展形成了网状结构, 对此有两种模型对其进行描述^[21]: “房卡”模型的原理是弱的带正电的粒子边缘与带负电的粒子表面相互吸引; 另一种模型就是粒子的边缘与边缘相连接构成平滑的绸带。



凝胶规则的薄片状微观结构是由几种表面活性剂，或表面活性剂与长链脂肪酸的混合物在水中形成的。10% (w/w) 的十八醇十六醇混合物中加入 0.5% 的溴化十六烷基三甲基铵表面活性剂^[22]，这样构成的凝胶，用小角度 X 射线 (SAXS) 散射测定为规则薄片结构的凝胶模型。相反，Brij 96 凝胶的微观结构取决于表面活性剂的浓度。由 SAXS 检测发现，如果水中表面活性剂浓度为 40 wt%~60 wt%，凝胶是六角形的液晶结构；如果表面活性剂浓度更高 (70wt%~85wt%) 则扩展呈薄片状的结构^[23]。

凝胶和冻胶的物理性质

凝胶和冻胶的物理性质可分为两类：变异特性（包括凝胶点、凝沉和离浆）和流变学特性（包括硬度、屈服点和断裂力）。对测定这些物理性质的实验技术可以进行简单分类^[24]。分光光度计和热分析法用来确认凝胶的微观结构（物理的接点区）及其相关的变异特性。比如，核磁共振光谱技术（NMR）可以在凝胶形成之前用来测定聚合体的结构及动力学特性；原二色谱（CD）可以测定网状结构形成过程中聚合物的构象变化，如螺旋结构与螺圈结构的转化；一些机械装置可以用来测定凝胶的流变学特性。这些技术的工作原理有两个：其一，利用小变形测定得到黏弹性参数；其二，利用大变形测定得到完整的应变应力曲线，也包括一些故障参数。

1. 变异特性

1.1 溶胶到凝胶的转变（胶凝点）

溶胶到凝胶的转变取决于聚合物的浓度和反应温度。前面提到的分光光度计通过测定凝胶的临界浓度来探测溶胶到凝胶的转变。热分析法包括使用差示扫描量热仪，测定溶胶到凝胶的转变或者热可逆性凝胶的熔点温度。Eldridge 和 Ferry^[25] 提出计算凝胶热的关系式，式中溶胶到凝胶转变温度取决于聚合物浓度。

凝胶的临界浓度，指在实验条件下低于此浓度时无肉眼可见的凝胶形成^[24]；更确切地说，即指由聚合物和溶剂一起形成溶胶的浓度。此浓度取决于聚合物与聚合物之间、聚合物与溶剂之间的相互作用，聚合物的亲水亲脂性，以及化学链的分子质量与柔顺性^[26]。而且，如果有离子加入形成的凝胶，临界浓度取决于这些离子添加剂的浓度和许多其他的变量因素。表 2 列出了聚合物在水中形成凝胶的最小浓度范围。

热可逆性凝胶有两个凝胶点，改变温度至凝固点时形成固态凝胶，温度变化至熔点时则为液态凝胶。此外，如果一些凝胶的凝固温度比熔点温度低，则会出现温度磁滞现象。这种现象说明凝胶的接点区构成了联合体^[12]而不是形成相同的交联。琼脂凝胶有这种磁滞温度，凝固点温度为 40℃，而熔点温度为 90℃。

表 2 制剂产品中的胶凝浓度

物质	胶凝浓度/wt%	添加剂
蛋白质		
胶原蛋白	0.2~0.4 ¹⁾	
明胶	2~15	
多糖		
琼脂	0.1~1	
海藻酸	0.5~1	Ca ²⁺
	5~10	Na ⁺
κ角叉菜胶	1~2	K ⁺
树胶（低乙酰化）	0.5~1	Ca ²⁺
甘草（Glycyrrhiza）	2	
瓜尔胶	2.5~10	
	0.25	硼酸盐离子
透明质酸	2	
果胶（低甲氧基）	0.8~2	Ca ²⁺
淀粉	6	
黄蓍胶	2~5	
半合成聚合物		
（纤维素衍生物）		
羧甲基纤维素	4~6	Na ⁺
	10~25	Na ⁺
羟丙基纤维素	8~10	
羟丙基甲基纤维素	2~10	
甲基纤维素	2~4	
合成聚合物		
卡波姆	0.5~2	
泊洛沙姆	15~50	
聚丙烯酰胺	4	
聚乙烯醇	10~20	
无机物		
氢氧化铝	3~5	
膨润土	5	
硅酸镁锂	2	电解质
表面活性剂		
十八醇、十六醇混合物	10	溴化十六烷基三
Brij96 ²⁾	40~60	甲铵

1) 调节至 pH>4，加热至 37℃。
2) Brij30-99 表面活性剂是聚氧乙烯烷基醚。

1.2 物理老化

许多凝胶结构还没有达到平衡时，不同的制备方法和条件都会影响凝胶形态。凝胶趋向平衡时会出现性质老化，因此在测定凝胶物理性质时要考虑凝胶样品的放置时间。老化反映出凝胶的微观结构发生了变化，这时非共价键断裂并进行重整。而且，在一些聚合物凝胶中，出现了由于不平衡状态造成的结构不稳定，两个典型的例子是凝胶的凝沉和离浆。

凝沉（retrogradation）是聚合物溶液放置形成凝胶的一种自然转化现象。聚乙烯醇溶解在水中要经过凝沉的过

程,随着溶剂的凝沉老化,规则的聚合链形成微晶聚集体^[14]。聚乙烯醇也可以凝沉形成结晶区。淀粉酶是淀粉中的线性多糖部分,经降解,随时间的流逝,也会降低淀粉溶液和凝胶的物理稳定性。

离浆(syneresis)是液体自然从凝胶基质中释放的过程。这种不稳定性是由凝胶的不平衡状态造成的,或者是由其外部条件的变化而产生的。平衡状态时,由于渗透压差的存在,使聚合链的弹性收缩力与溶剂的膨胀力相抗衡^[27]。条件变化时,如温度改变,渗透压发生改变,引起聚合链的弹性收缩,结果凝胶收缩,将多余的液体挤出凝胶基质。琼脂凝胶和角叉菜胶是这种离浆脱水现象的典型事例。

2. 流变学特性

和凝胶的物理变异特性一样,凝胶的流变学特性不容易测定,因为其与聚合物性质、凝胶样品放置的时间、试验条件都有紧密联系。而且,随着交联密度的增大,或聚合物浓度及聚合物平均分子质量的增加,凝胶的表观黏性会增强,凝胶强度也会增强。但是,随着温度升高,聚合物和溶剂之间分子的相互作用会使凝胶的表观黏度增强或减弱。此外,如果有添加剂与凝胶混合在一起,如离子、非电解质、溶剂或非溶剂,以及其他共溶聚合物,都能使凝胶表观黏度改变的方向难以预测。

2.1 黏弹性

在一定的压强——单位面积的压力作用下,理想液体发生流动,良好的弹性固体发生形变。切应速率 dy/dt 是对液体变形的测定;黏度 η 是液体流动的阻力;拉伸力 γ 是对固体变形的测定;切应系数 G 是在固体表面外压下对其拉伸力的抵抗力。很显然,凝胶是具有黏弹性的物质,在一定压力下,是具有固体和液体双重性质的半固体物质。

根据凝胶的流变学特性可将物理键合的凝胶分为三类:网状缠结结构的凝胶、硬凝胶和软凝胶^[24]。在临界浓度以下,将网状缠结状的凝胶稀释到临界浓度以下形成稀溶液;硬凝胶具有压力-拉伸力曲线,存在裂点。瓜尔胶和透明质酸能形成网状缠结结构的凝胶;琼脂、藻酸钙、明胶和果胶形成硬凝胶。

软凝胶同样也是一种网状缠结结构,但要通过特殊分子之间的相互作用来增加其拉伸力^[24],所以,软凝胶的流变学特性介于网状缠结凝胶和硬凝胶之间。黄素凝胶和卡波姆能形成软凝胶。透明质酸通常形成网状缠结结构,在特殊条件下(pH为2.5和0.15mol/L的盐液)也可以形成软凝胶^[28]。

2.2 流动类型

可以通过连续剪切仪测定网状缠结凝胶和软凝胶的流动性,如Ferranti-Shirley圆锥体和平板黏度计。这些仪器用切应速率范围表示凝胶的行为。为了辨别凝胶的流动行为,通常需要一个完整的流变学图来描述特殊的凝胶。在

切应力-切应速率的坐标轴上,如果切应力对切应速率的曲线呈凹形,那么凝胶表现出的是假塑性流动。随着切应速率的增加,凝胶的内部结构发生断裂,所以凝胶表观黏度随切应速率的增加而降低。但是,如果凝胶仅在一个有限的压力下流动,则表现出的是塑性流动。屈服点是测定凝胶的强度,即凝胶开始流动时的压力。一般来讲,网状缠结结构的凝胶和软凝胶分别表现出假塑性和塑性流动。

以上这两种凝胶不仅有假塑性或塑性流动的表现,而且还有触变性或者时间依从性流动的表现。触变性以磁滞圈的形式出现。凝胶需要一个有限的时间重整被破坏的规则结构,这时就出现了触变性现象。触变的程度取决于凝胶的类型、样品的放置时间和试验条件。

动态振荡技术利用小变形测定方法测定凝胶线性区域中的黏弹性。不同于连续剪切仪,动态振荡器产生的正弦式振荡压力或拉力只是小变形的,优点是没有改变凝胶的微观结构,如Weissenberg流变仪。一个理想的弹性固体,在压力和拉力作用下都在同相;而一个理想的液体,压力和拉力的相相差90°。黏弹性的物质包括凝胶,相角在0°~90°之间。由振荡试验得到的参数有:储存系数 G' ,反映了凝胶的固态性质;损耗系数 G'' ,反映了凝胶的液态性质,这些参数都由振荡频率决定。

文献对连续剪切和动态振荡对制剂中半固体物质的测定有详细的叙述^[29,30]。文献进一步阐述有关黏弹性的原理,并对数据进行了分析、讨论和解释。

2.3 刚性

刚性系数或剪切系数(G),即剪切力与拉力的比值,是对凝胶阻抗变形能力的一种测定。硬凝胶阻抗自身重力作用变形的最小硬度等于 $g\rho l$,即重力加速度(g)、密度(ρ)和样品尺寸(l)的乘积。因此,1cm长的凝胶样品的最小硬度大约为100Pa(10³ dyn/cm)。

凝胶刚性一种经验的测定就是测定凝胶力,即人们熟知的Bloom力。美国药典记载了具体的操作方法^[31]。使用Bloom胶凝计在10℃测定17h,测量需将标准活塞伸入6.67% (w/w) 凝胶表面以下4mm。但是现在Bloom胶凝计已经被Stevens LFRA/Voland织物分析仪和TA.XT2织物分析仪所代替。

2.4 破裂力

破裂力是硬凝胶破裂时的压力而并非是拉力。破裂力由仪器的大变形方式测定,比如Instron测定仪,将强压力作用于样品。然而,硬凝胶如果能够承受自身的重力^[24],其破裂力可以由张力测定。大多数物理键合的凝胶相对柔软,所以测定较困难。

凝胶的形成物质及在药剂中的应用

形成凝胶的亲水性聚合物常用来制备无脂的半固体制剂,包括牙齿、皮肤、鼻腔、眼部、直肠以及阴道使用的

凝胶和冻胶。含有治疗成分的凝胶载体对于黏膜、溃疡或烧伤组织的治疗特别有用,因为其含水量高减少了对受损组织的刺激。而且这些亲水性凝胶也容易轻轻地冲洗掉或被体内组织液自然清洗掉,可以减少凝胶与机体组织之间机械摩擦。一些合成的聚合物凝胶如泊洛沙姆、卡波姆凝胶,高度透明,近来人们热衷于用它来研制治疗眼部疾病的凝胶。

人们正在开发非传统给药途径的凝胶制剂,目前两种鼻腔给药的凝胶剂已开发成功并上市。Schwarz Pharma 公司的维生素 B₁₂ 鼻腔用凝胶,作为膳食补充剂。凝胶基质为亲水性纤维素的衍生物,其确切的性质没有公开。但是,该凝胶无臭无刺激,能很好地黏附于黏膜。Sanofi Wintrop 公司的去氧肾上腺素凝胶是甲基纤维素的水溶性鼻腔用凝胶,其中含有解充血药盐酸去氧肾上腺素。

除了作为药物载体,凝胶还具有其他的重要用途。比如,软凝胶用于烧伤的皮肤,其所形成的物理屏障能够防止过多水分缺失;眼用置入凝胶能够不断地润滑眼睛并促进愈合;还有其他的凝胶作为外科润滑剂和医疗设备,能够使局部刺激降至最低。

许多形成凝胶的物质可用来制备药用凝胶和冻胶。尽管这些物质有一些共同的比较特殊的物理性质,但实际我们只使用某些物质或混合物。具有特殊用途的药用凝胶的性质如表 3 所示。

1. 蛋白质

1.1 胶原

胶原是动物体内一种重要的结缔组织蛋白。胶原蛋白分子是一种嵌段共聚物,由 33% 的甘氨酸、23% 的脯氨酸和羟基脯氨酸嵌段构成,嵌段之间还含有 44% 的氨基酸。原胶原蛋白是胶原蛋白中的不对称亚单位,由三条多肽链缠绕成三螺旋状而成。胶原蛋白的非螺旋区叫做尾肽,容易受到酶的分解。天然的胶原蛋白在水中不溶解,但在稀酸溶液中能溶解 2%~3%。胶原蛋白的尾肽部位由于能被蛋白水解酶所分解,所以能在蛋白水解酶的溶液中溶解,如 Collagen Corp 公司的 Vitrogen。

表 3 药用凝胶

应用	优良性质
牙科	高度触变性 龟裂填料的最佳黏性 牙釉质表面的黏附性 透明 水溶性 口服易消化
皮肤科	触变性 良好的涂展性 无油脂(特别适宜痤疮制剂) 易清除

续表

应用	优良性质
皮肤科	柔润性 缓和剂(特别适宜刮擦组织) 无污染 与许多辅料可相容 水溶性或互溶性
鼻腔	黏附性 无臭 无刺激 水溶性
眼科	透明 无菌 黏膜相容性 润滑性 缓和剂 无刺激或非致敏性 水溶性或互溶性
外科和医疗过程	润滑性 黏附于仪器表面 与黏膜最大化的接触 无刺激
阴道	酸稳定性 黏附性 体温时非液化 缓慢溶解 润滑性 无油脂 无刺激

胶原蛋白的不对称分子结构形成了硬凝胶。高硬度的凝胶在 0.1% 浓度时可以通过紫外光引发或添加醛类化学交联剂形成^[32]。这些天然材质的凝胶可作为生物材料替代玻璃体。溶解胃蛋白酶的为透明的硬凝胶,其制法是:将 0.2%~0.4% 胶原蛋白溶液冷却到 5℃,含有游离的分子和细小纤维形成透明的硬胶;当温度上升到 37℃,胶原蛋白分子聚集形成亚纤维,再进一步聚集便形成了凝胶的网状结构^[33];然后在醛的化学交联作用之下便得到了硬凝胶的刚性结构。

有人考虑将透明的胶原凝胶用于眼部给药。琥珀酰基化或甲基化胶原蛋白的眼部植入剂作为可溶性给药装置,已经获得专利^[34]。以交联的胶原蛋白或其他胶原蛋白衍生物为载体,制备的盐酸毛果芸香碱控释植入剂^[35],能够持续释药 5~15 天。由 Bausch & Lomb 公司研制的角膜隔离屏 Bio-Cor 已经上市,这种角膜隔离屏是利用非交联的胶原蛋白制备而成,放于眼睛受伤部位,随着胶原蛋白的缓慢溶解,角膜不断得到润滑并促进伤口的愈合。胶原蛋白埋植剂(lacrimedics)在 7~10 天内溶化,能够局部堵塞泪管,用于改善干涩眼睛的不适症状。胶原蛋白凝胶还可以用来止血。用弱交联化的胶原凝胶制成的无菌止血钳,能

够在外科手术中形成凝血块从而抑制出血,如强生公司的 Instat hemostat。

1.2 明胶

明胶是一种变性的胶原蛋白,在酸性或碱性条件下水解分别生成 A 或 B 两种类型。经酸处理得到的明胶,其氨基酸含量与原来明胶中的含量相当,等电点为 pH8~9。相反,碱处理得到的明胶,氨基基团与羧基基团的比例减小,等电点转为 pH4~5。明胶在足够浓度的溶液中经冷却可形成可逆性的弹性凝胶。凝胶的微观结构是通过接点区聚集一起形成一种三维网状结构,在这种结构中,明胶分子链部分折叠形成胶原母体分子的三螺旋结构^[36]。明胶凝胶的物理性质由蛋白质含量、平均相对分子质量、温度、pH 及添加物共同决定^[37]。

对非交联的 B 型凝胶薄膜在无添加剂^[38]和有添加剂^[39]的情况下,各自的膨胀动力学人们进行了相关的研究。利用化学交联的聚合物基质吸水膨胀^[40]的动力学性质,制备药物的控释给药。热交联的明胶基质同样可用于药物释放的研究^[41]。交联之间的分子质量 M_c 和交联之间的筛孔大小 ζ ,用来评价大分子右旋糖酐从明胶基质中的释放^[42]。从非交联的氨基基团的化学分析中可直接测定明胶的交联度和交联密度,并与交联的膨胀系数进行比较^[10]。

尽管在制药工业上,明胶主要用于制备软胶囊和硬胶囊,但是一些商业产品也会用到含水凝胶。促皮质素凝胶是一种无菌产品——H. P. Acthar Gel (Rorer),明胶含量 16%,在肌内注射和皮下注射时能维持促皮质素激素的释放。一种无菌的可被吸收的凝胶海绵——辉瑞公司的 Gelfoam,具有弱交联的基质,在外科手术中用于吸收渗血,促进凝血。一种可吸收的明胶软片——辉瑞公司的 Gelfilm Ophthalmic,也经常用于眼科手术中。凝胶的眼部植入剂完全被溶解吸收只需要 2~5min。

2. 多糖

2.1 海藻酸盐

海藻酸是褐海藻经稀酸处理,经碳酸钠碱化后得到了水溶性的海藻酸钠。海藻酸由线性糖醛酸由聚甘露糖醛酸嵌段(M)、聚葡萄糖醛酸嵌段(G)以及这两种糖醛酸嵌段(MG)^[43]的混合块构成,不同的海藻酸盐,其胶凝性质和凝胶的微观结构取决于 M, G, 及 MG 块的浓度。高 M 浓度的海藻酸形成混浊的弱凝胶;高 G 浓度的海藻酸形成透明易脆的凝胶。凝胶的胶凝作用取决于离子类型:海藻酸钠凝胶是水溶性的,但海藻酸钙却是水不溶性的,不过在水中能吸水膨胀。许多鸡蛋盒模型的接点区就是由钙离子构成, G 块生成硬凝胶的网状结构。

海藻酸钠和海藻酸钙在已上市的制剂品种中都有使用。海藻酸钠凝胶具有更好的涂布和润滑作用,且无臭无味,能使皮肤柔润。而且海藻酸钠与许多化合物都能相容,如淀粉、羧甲基纤维素钠、果胶、角叉菜胶、25%乙醇、4%

氯化钠以及大多数碱盐^[44]。由于具有较好的相容性,同时又具备凝胶的特性,海藻酸钠与羧甲基纤维素钠一起制备成无刺激的水溶性润滑凝胶制剂——Ortho 公司的个人润滑剂。海藻酸钙用作创伤敷料来治疗关节肿胀和褥疮^[45]。使用时,海藻酸钙能够吸收组织渗出液形成亲水性凝胶,从而促进受损部位的愈合。硬度较高的海藻酸钙凝胶适宜制备牙科制剂,它作为药物基质可以控制药物的释放^[46]。用海藻酸钠和乳酸钙对茶碱颗粒进行包衣,形成水不溶性的凝胶,并进行了茶碱的释放试验^[47]。

2.2 角叉菜胶

角叉菜胶是一种从红海藻中提取得到的硫酸化多糖,根据红海藻的种类、生长季节及生长环境,可将角叉菜胶分为不同的类型。其中三个主要的类型即 λ -、 ϵ -和 κ -角叉菜胶,含有交替排列的 (1→4) 交联的 β -D-吡喃半乳糖和 (1→3) 交联的 α -O-吡喃半乳糖残基,但是硫酸化的程度和位置有所不同^[48]。在这三种类型中,仅 λ -海藻酸不能形成凝胶。

在合适的离子浓度和聚合物浓度下,同时又有阳离子存在时, κ -角叉菜胶能够形成坚硬的、热可逆性凝胶。这些凝胶的弹性系数取决于阳离子类型并遵循 Hofmeister 顺序: $\text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ \gg \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ 。 κ -角叉菜胶会发生离浆,液体从基质中自然渗出。早期有关胶凝过程的模型,是想象多糖链折叠形成双螺旋,并进一步构成接点区的多螺旋过程。在这个模型中,由于螺旋区域的形成需要阳离子自身的介入^[49],所以胶凝需要阳离子来进行调节。但是其他的研究认为^[50]:在胶凝过程中,阳离子的间接作用是改变 κ -角叉菜胶螺旋区域的溶剂结构,从而诱导凝胶的形成。差热扫描和等温滴定量热法可用来研究单价和二价钙离子的络合,以及在 κ -角叉菜胶中所诱导的构象变化^[51]。

由 κ -角叉菜胶和钾离子形成的凝胶具有优良的润滑和柔滑特性。由于具备如此良好的凝胶性质,这些凝胶可作为局部给药的载体,也可以在其他制剂制备中作为胶凝剂。它们也可以和羧甲基纤维素钠混合使用,后者阻滞凝胶的形成,使制得的凝胶具有不同的黏度和质地。以 κ -角叉菜胶、 ϵ -角叉菜胶、KCl 或 CaCl_2 ^[52]为骨架基质,制备了茶碱和双氯芬酸骨架片,并进行药物的释放研究。

2.3 透明质酸

透明质酸是一种线性的氨基葡聚糖聚合体,在关节组织液和结缔组织细胞间质中是一个重要组分。透明质酸是一种生物凝胶,能维持细胞形态和组织的水和作用,可作为关节的润滑剂和震动吸收剂^[53]。透明质酸在 2% 浓度时形成透明的硬凝胶,但没有琼脂和角叉菜胶硬。这种凝胶的微观结构由多糖长链缠结而成,分子质量为 $1 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ Da,并取决于动物组织的来源。

由 Kabi Pharmacia 公司生产的黏弹性凝胶 Healon 中含有 1% 钠盐,在眼科手术中已经得到广泛的使用。透明质酸钠凝胶无刺激性,在手术时可作为黏弹性介质用于分离组

织,并能防止术后组织粘连^[53]。在一项临床试验中,向关节腔内注射 500~730kDa 分子质量的透明质酸钠作为关节内的连接物,用于关节炎的治疗,有关的临床试验研究证明,这种方法可以促进组织结构的愈合^[54]。利用透明质酸将托吡卡胺制成眼部凝胶^[55],由于透明质酸具有黏膜黏附特性,所以此凝胶能提高托吡卡胺药物的生物利用度。

2.4 果胶

果胶是一类多糖复合物,其结构随植物来源不同而变化。果胶是一种杂多糖,从苹果渣和柑橘果实皮中提取获得,主要含聚半乳糖醛酸。果胶的酯化程度决定胶凝过程及最终的商品化。在酸性环境中,高浓度蔗糖脱水形成高甲氧基含量的果胶凝胶。在一些甜品如果酱、蜜饯中都有高甲氧基的果胶。

相反,低甲氧基的果胶凝胶在二价阳离子,特别是钙离子的存在下,以与海藻酸钙一致的鸡蛋盒机理形成凝胶。而且,果胶酸钙凝胶在中性条件下制得,具有热稳定性,而酸性条件下制备的凝胶具有热可逆性^[56]。胶凝强度取决于酯化度(最佳酯化度是 30%~50%)、酯基基团的分布及平均分子质量。低甲氧基果胶和高岭土形成的凝胶常在一些止泻制剂中使用,高甲氧基果胶用来制备控释制剂的基质^[57]。吡罗昔康的果胶微球与上市的滴眼剂相比,前者能提高家兔眼部的生物利用度^[58]。

2.5 淀粉

淀粉是高等植物中的一种主要的多糖,能从许多植物

中提取获得,包括玉米、小麦和马铃薯。淀粉粒分为两种结构不同的多糖:30%直链淀粉(线性聚合物)和 80%的支链淀粉(支链聚合物)。淀粉结构中由于多糖链之间存在大量的氢键,因此在冷水中不能溶解。但是,如果温度超过胶凝温度范围(60~70℃),氢键发生断裂,使淀粉粒吸水膨胀。淀粉溶胶冷却时便形成凝胶。凝胶类型取决于淀粉种类:玉米淀粉形成不透明的硬凝胶,而马铃薯淀粉则形成透明的软凝胶^[59]。

淀粉凝胶的微观结构就如同被一个填充物加固的基质。加热时,使支链淀粉粒膨胀疏松,直链淀粉粒溶解。随着溶剂慢慢变冷,直链淀粉粒形成凝胶基质,并贯穿在支链淀粉的多孔洞结构中,这样就形成了强化凝胶^[60]。

淀粉水溶液存在晶粒聚集体自发的布朗运动,所以也表现出凝胶的凝沉现象。随着溶液的凝沉老化,颜色变成乳白色,随即淀粉开始逐渐沉淀。淀粉凝胶是由晶粒聚集而成的,尽管经历了离浆脱水的过程,但也同样不稳定。直链淀粉是平行排列而聚集在一起的,它引起淀粉凝胶的不稳定。淀粉在药剂中的应用很广泛,如作为片剂中的辅料(如填充剂、黏合剂以及崩解剂)。淀粉凝胶作为皮肤润滑剂的使用很有限,但现在淀粉已经作为微粒中的黏膜黏附剂使用,通过黏附于黏膜可以提高蛋白质的吸收^[61]。

2.6 其他碳水化合物

表 4 列出了几种不常用的碳水化合物及其性质,同时也列出了有关的产品和使用情况。

表 4 各种多糖凝胶剂及其用途

凝胶剂	备注	产品及应用	参考文献
琼脂	90℃以上稳定	分子结构	[62]
	0.1%浓度形成硬凝胶	容积性泻药	[63]
	多螺旋接点区	胰岛素的直肠给药	[64]
		与 CMCNa 一起作为栓剂基质	[65]
胶凝糖胶	透明	噻吗洛尔-XE	
甘草 (glycyrrhiza)	加入阳离子形成凝胶	眼部给药的原位凝胶聚合物	[66]
	凝胶具有假塑性和触变性	提高降钙素的直肠吸收	[67]
	有效掩盖苦味	抗病毒碘苷的制剂载体	[68]
瓜尔胶	pH < 7 时呈液态		[69]
	不电离	硫酸奎宁丁的持续释药	[70]
	离浆	特殊药物直肠给药的载体	[71]
黄蓍胶	对酸稳定 (pH~2)		[72]
	恢复阴道的酸性环境	Aci-Jel (Ortho)	
	凝胶载体	硫酸麻黄碱凝胶	

3. 半合成聚合物(纤维素衍生物)

3.1 羧甲基纤维素钠

羧甲基纤维素钠(CMCNa)是一种羧基酯化的纤维素,是植物纤维组织中一种常见的多糖。纤维素中 2-吡喃

葡萄糖上的羟基被羧甲基取代。取代基的数目就称为取代度(DS)。DS 和聚合物链长共同决定了羧甲基纤维素钠的溶解度、黏弹性和凝胶强度。CMCNa 能在水中溶解,也能在混有少量乙醇和丙三醇的水中溶解。这种水溶性凝胶在 pH2~10 的环境下比较稳定,但容易滋生细菌。

通过透射电子显微镜可以观测 CMCNa 凝胶的微观结

构^[73], 结果发现在细微的准晶体结构中存在 2~3nm 的纤维丝。这些纤维丝是由单个的聚合链聚集而成的微聚集体。如果加入 Al^{3+} 或 Fe^{2+} 等多价阳离子, 在离子和电离的羧基团之间形成架桥^[74], 这样就可以增加 CMCNa 凝胶的硬度, 但这样的凝胶稳定性尚无法确定。

CMCNa 对酸稳定, 比较适宜制备阴道凝胶。Ortho-Gynol 避孕凝胶剂, 在制备时, 将 CMCNa、水和丙二醇混合, 用乙酸调节 pH 到 4.5, 这样便可以形成凝胶。

Paddock 公司的 Glucose 也采用 CMCNa 作为凝胶基质, 含有 40% 的葡萄糖, 用于治疗低血糖症。含有重组人体血小板生长因子的 CMCNa 凝胶, 用于治疗糖尿病引起的非愈合性溃疡, 此项研究结果表明, 基质本身与良好的伤口护理相比治愈率更高^[75]。

3.2 羟丙基纤维素

羟丙基纤维素是在纤维素的碱性环境中, 用氧化丙烯取代羟基而形成的。这种纤维素衍生物不仅能溶于冷水, 而且能溶于许多极性有机溶剂(如甲醇、乙醇、异丙醇和丙二醇)^[76]。随着羟丙基取代基团的增大, 在乙醇中的溶解度也增大。羟丙基纤维素的水溶液对酸不稳定, 易发生水解, 因此 pH6~8 稳定性最好, 但也可能发生光降解和少量的生物降解反应。

羟丙基纤维素凝胶加热形成热可逆性凝胶。这种凝胶制剂的优点是对乙醇相容性好, 通过研究凝胶的微量黏度可预测药物扩散速率^[77]。这种以醇性和羟醇性凝胶为基质的制剂上市产品如表 5 所示。

3.3 羟丙基甲基纤维素

羟丙基甲基纤维素(HPMC)制备方法与羟丙基纤维素相同, 只是在反应过程中加入了氯化甲烷。羟丙基和甲基这两种取代基的含量范围有所不同, 羟基为 3%~12%, 甲基为 19%~30%。HPMC 能溶于冷水和分子质量小于 600 Da 的聚乙二醇, 但 HPMC 却不能溶于乙醇, 不易水解, 在 pH3~11 条件下性质稳定。

HPMC 加热时形成水溶性的凝胶, 胶凝点根据级别的不同, 胶凝点温度范围为 50~90℃^[78]。加入少量与水相融的溶剂(如甲醇、乙二醇), 能够提高凝胶点。仅含有少量水分并以 HPMC 为基质制备的凝胶制剂如表 5 所示。Astra 含 2% 的利多卡因凝胶剂, 具有良好的润滑性和黏附性, 能够减小治疗过程中的不适症状。Storz 公司上市的 OcuCoat 为 2% 羟丙基甲基纤维素溶液(80kDa), 是眼外科手术中的辅助药。有人以羟丙基纤维素和甲基纤维素为基质, 制备了吡啶美辛、盐酸普萘洛尔、盐酸四环素凝胶制剂, 并对它们的性质和特征膨胀进行了研究^[79]。

表 5 含有羟丙基纤维素或羟丙基甲基纤维素的凝胶剂产品

商品名	生产厂商	治疗药物; 功效	乙醇含量/%
羟丙基纤维素			
Compound W Gel	Whitehall	水杨酸; 促角质层分离剂	67.5
DuoPlant Gel	Schering-Plough	水杨酸; 促角质层分离剂	57.6
Erygel	Herbert	红霉素, 治疗痤疮的抗生素	92
Hydrisalic Gel	Pedinol	水杨酸; 促角质层分离剂	100
Keralyt Gel	Summers	水杨酸; 促角质层分离剂	19.4
Lacrisert Insert	Merck & Co.	羟丙基纤维素; 润滑剂	0
Retin-A Gel	Ortho	维 A 酸; 抗痤疮药物	90
羟丙基甲基纤维素			
ArthriCare Triple-Medicated Gel	Commerce	水杨酸甲酯; 甲醇, 烟酸甲酯; 搽剂	
Persa-Gel W	Ortho Derm	过氧苯甲酰; 抗菌药物	
Xylocaine Jelly	Astra	盐酸利多卡因; 麻醉剂	

3.4 甲基纤维素

甲基纤维素是在 2-吡喃葡萄糖中由甲基取代羟基的一种纤维素。甲基纤维素中甲氧基含量较低时能在冷水中溶解, 增加取代基的数目能够增大甲基纤维素在含羟醇和乙醇溶液中的溶解度^[80]。

当加热甲基纤维素凝胶的溶液时, 凝胶网状结构中形成了类胶束的接点区。胶凝力和胶凝温度取决于浓度、取代程度及平均相对分子质量。加入糖或电解质能够减少聚合物水合作用, 从而降低胶凝温度。

制剂凝胶常用黏度较高的甲基纤维素。这种凝胶是较好的缓和剂, 并具有较好的表面活性, 能很好地在人体组织中分散。由于甲基纤维素凝胶能减少水分损失, 易于移去, 所以常被用作烧伤组织的敷料。这种高黏度的凝胶在眼科制剂中使用, 如 Bausch & Lomb 公司的人工泪液和 Sanofi Winthrop 公司的脱氧肾上腺素黏溶液。甲基纤维素还有其他的应用, 如 SK Beecham 公司的缓泻药 Citrucel, 以及供手术和治疗的润滑凝胶。盐酸四环素的甲基纤维素凝胶可局部用药^[81]。大鼠试验的研究发现, 3% 的甲基纤维素凝胶能够缓慢消除黏液纤毛, 所以具有较好的生物黏附性^[82]。



4. 合成聚合物

4.1 卡波姆

卡波姆是一种合成的聚丙烯酸树脂，由 0.75%~2% 的聚烷基蔗糖^[83]共聚而成，其水溶性分散体系必须防止细菌的滋生。卡波姆是一种大分子的聚合物，在三分之二的重复单元上含有羧基。在 pH5~10 的中性环境中，有金属碱或者胺如二异丙醇胺三乙醇胺存在时，可形成卡波姆的凝胶。中性 pH 条件下，由于电荷排斥使卡波姆长链伸展，形成了缠结的网状结构。由于静电斥力在凝胶的形成中非常重要，因此凝胶的黏度和凝胶强度都取决于 pH 和其中盐的含量。

卡波姆的分子大小是决定其性质和应用的一个重要因素。卡波姆 934 和卡波姆 940 的平均分子质量分别是 3×10^6 Da 和 4×10^5 Da，在药剂生产中应用很普遍。这两种规格的卡波姆在局部应用时都具有较好的流变学特性，凝胶

会有塑性流动^[84]，而且黏度也较稳定^[85]。凝胶中可以加入大量的乙醇，但是乙醇会引起网状结构的脱水从而降低其黏度。其黏度随温度变化不大。Ostrenga 等系统地研究了以丙二醇为介质的含 1% 卡波姆的凝胶，优化丙酸氟氢松和氟轻松的经皮吸收^[86]。发现在特定条件下，如果提高类固醇在基质和肉豆蔻酸异丙酯之间的分配系数，就能增加药物的经皮吸收。这些研究为类固醇凝胶制剂的应用提供了依据。

卡波姆与二甲基亚砷具有很好的相容性。Syntex Veterinary Labs 公司的 Domoso 是一种兽药凝胶，含有卡波姆 934 和 90% 的二甲基亚砷。卡波姆 940 凝胶比卡波姆 934 凝胶更透明^[87]，可以用来制备眼用制剂。但是仅有卡波姆 934 能在体内使用。醋酸曲安西龙^[88]、阿昔洛韦^[89,90] 的卡波姆凝胶具有黏膜黏附性，这种凝胶通过鼻腔黏膜给药可以提高蛋白质的吸收^[61]。表 6 列出了一些含卡波姆的凝胶制剂产品。除了 Whitehall 公司的 Anbesol Gel 和 Alcon 公司的 Pilopine HS，其他都是用于皮肤的凝胶产品。

表 6 含有卡波姆的凝胶制剂产品

商品名	生产厂商	治疗药物；功效
卡波姆 934		
Anbesol Gel	Whitehal	苯佐卡因，麻醉剂；防腐剂
Cleocin T Gel	Upjohn	克林霉素，抗生素；抑制痤疮生成
Persa-Gel W	Ortho	过氧苯甲酰；抗菌剂
Therapeutic Mineral Ice Gel	Bristol-Meyers	薄荷醇；搽剂
Ben-Gay Vanishing Scent Gel	Pfizer	薄荷醇，樟脑；搽剂
Sportsman Ice Gel	Thompson	薄荷醇；搽剂
卡波姆 940		
Benzac W	Galderma	过氧苯甲酰；抗菌剂
Benzagel	Dermik	过氧苯甲酰；抗菌剂
Benzamycin	Dermik	红霉素，过氧苯甲酰；抗生素，抗菌剂
Desquam-X 5	Westwood Squibb	过氧苯甲酰；抗菌剂
Double Ice ArthriCare Gel	Commerce	薄荷醇，樟脑；搽剂
Estar Gel	Westwood Squibb	煤焦油；治疗牛皮癣
Flex-all 454 Gel	Chattam	薄荷醇，甲基水杨酸；搽剂
Lidex Gel	Syntex	醋酸氟轻松；抗炎剂
Ordor Free ArthriCare Rub	Commerce	薄荷醇，烟酸甲酯，辣椒碱；搽剂
Persa-Gel	Ortho Derm	过氧苯甲酰；抗菌剂
Pilopine HS	Alcon	盐酸毛果芸香碱；缩瞳剂
PrameGel	GenDerm	丙吗卡因；止痒剂
Topicort Gel	Hoecht Marion Roussell	去羟米松；抗炎剂

4.2 泊洛沙姆

泊洛沙姆是一系列嵌段的通用名，是两段聚氧乙烯嵌段中间夹有一段聚氧丙烯的结构。例如，泊洛沙姆 188 可以写成： $(\text{PEO})_{75}-(\text{PPO})_{30}-(\text{PEO})_{75}$ 。结构中由于存在亲水性的聚氧乙烯嵌段，同时又具有疏水性的聚氧丙烯嵌段，所以将泊洛沙姆作为一种高分子的表面活性剂来使用。

在相对较高浓度时（20%）泊洛沙姆形成热可逆性凝胶，但泊洛沙姆受热比冷却更容易胶凝。泊洛沙姆的这种两性性质使其在室温或室温以上时，形成类胶束的接点区从而形成凝胶。接点区含有大量的类胶束结构，形成了黏性的液晶相^[91,92]。泊洛沙姆在稀的羟醇溶液中也能形成凝胶。

泊洛沙姆具有许多优良的性质适宜做成人造皮肤，有助于治疗Ⅲ度烧伤。这种凝胶无毒，而且可以通过控制水

N

分、热量及电解质的流失而促进伤口的愈合,同时对伤口具有清洁作用^[93]。由于泊洛沙姆凝胶具有反向的热可逆性,所以将它的冷溶液涂抹在创面,提高温度便能够形成凝胶,同时用冷水也比较容易清洗掉。

泊洛沙姆凝胶模拟外观透明的黏液,适宜眼部给药。含有毛果芸香碱的泊洛沙姆凝胶比药物的水溶液更能提高其生物利用度^[94]。有人对利多卡因^[91]、双氯芬酸^[95]、氢化可的松^[96]的泊洛沙姆凝胶的释放动力学进行了研究和评价。大鼠试验发现,含有胰岛素的泊洛沙姆凝胶经皮下注射,能够延长药物的降血糖功能^[95]。现上市的泊洛沙姆凝胶制剂的药物有两种:一种是含有胱氨酸的泊洛沙姆 407 凝胶——Allergan Herbert 公司的 AquaTar;另一种是含有泊洛沙姆 182 和卡波姆 940 的混合凝胶——Galderma 公司的 Benzac W。

4.3 聚丙烯酰胺

聚丙烯酰胺(PAAm)是一种亲水性聚合物,能够吸收和储留大量的水分。但是 PAAm 的水溶液,特别是高分子质量的 PAAm,经过物理老化后其黏性有所降低。PAAm 在亲水的非水溶剂中是可溶解的,如甘油,但在甲醇和乙醇中则是不溶解的。

聚丙烯酰胺(PAAm)在浓度大约 4% (w/v) 时形成水凝胶,表现出假塑性现象。以 PAAm 为基质制备的毛果芸香碱凝胶,与其他凝胶为载体的制剂相比,前者在眼部的生物利用度比控释水溶液高三倍^[97]。有人对布洛芬从交联 PAAm 凝胶中的释放动力学进行了研究^[98],也有人研究了 PAAm 凝胶溶胀吸附胰岛素的动力学模型^[99]。

4.4 聚乙烯醇

聚乙烯醇(PVA)是一种亲水性的合成聚合物,通过水解聚乙烯乙酸酯间接可得到。由于聚合单体不稳定,所以它不能通过直接聚合乙醇而得到^[100]。PVA 的化学结构是一个简单的碳链骨架,其中交替带有羟基。PVA 的溶液、凝胶和固体中容易形成晶粒聚集体,PVA 在水、甘油及水和低浓度的乙醇混合溶剂中都可溶解,但容易从含硫酸盐、磷酸盐的水溶液中沉淀析出。较高浓度时 PVA 可能发生胶凝,10% PVA 在水中的胶凝点大约是 14℃^[101]。一般来讲,PVA 凝胶的胶凝力取决于每个样品的结晶度。

聚乙烯醇用于眼科制剂,在人工泪液中作为模拟黏液,如 Allergan 公司 Liguifilm Tears 和 Liguifilm Forte。PVA 低温时结晶型成物理键合的水凝胶,可以作为吲哚美辛直肠给药的载体^[102],化学键合的 PVA 水凝胶可以制成隐形眼镜。交联的相对分子质量 M_c 与筛孔尺寸 ζ 都可以表示共价交联的聚乙烯醇凝胶^[8]的一些性质。载有白蛋白的 PVA 水凝胶毫微粒制备成聚乳酸/羟乙酸微球,白蛋白连续释药达到两个月^[103]。伪麻黄碱和吸水膨胀的 PVA 基质一起压片,研究发现药物能从基质中释放^[104]。

5. 无机物

5.1 氢氧化铝

氢氧化铝是一种两相凝胶,是固体颗粒分散在水相形成的一种网状结构。氢氧化铝在酸和极碱的介质中能溶解,与许多添加物相容,如甘油、糖精和一些防腐剂^[105]。

氢氧化铝凝胶具有触变性,一些多元醇(如甘露醇和山梨醇^[106])能够提高它的稳定性。但是与其他凝胶不同,氢氧化铝凝胶没有润滑性,在制剂中大多用作制酸剂。

5.2 蒙脱石黏土

膨润土和锂蒙脱石黏土主要由含水铝和硅酸镁构成,其中膨润土具有膨胀性,1g 膨润土可吸收 11mL 的水。较常用的蒙脱石黏土是硅酸镁铝,如 R. T. Vanderbilt Co. 公司的 Veegum。这些黏土具有 1~2mm 的板状颗粒,当与水接触时便形成排列规则的凝胶中间相。5% 的浓度可形成凝胶,通过颗粒边与面之间^[21]相反电荷的引力作用,保持凝胶的稳定。因此蒙脱石凝胶与强电解质不相容,特别是二价和三价阳离子。这种凝胶液表现出塑性流动,带有静电,具有触变性。

硅酸镁锂黏土属于蒙脱石类,但它是一种合成的胶凝剂。与膨润土一样,硅酸镁锂在水中能膨胀,但仅在 2% 的浓度下才能形成凝胶。硅酸镁锂不含杂质,这是那些天然黏土无法具备的优点,但是在水相中必须加入一些电解质来支撑凝胶的微观结构^[107]。

蒙脱石黏土在药剂中主要用作混悬剂和增稠剂。由于这种黏土带有负电荷,所以通过离子交换可以吸收药物中阳离子。在酸性条件下,膨润土中甲硝唑的释放受到抑制,但在 pH7 时,药物的释放有显著提高^[108]。有人制备了含有蒙脱石和明胶的简单凝胶,对家兔进行胰岛素直肠给药的试验^[109]。后来,有人利用离体猪皮研究了在膨润土的高钙糊剂中,钙离子通过离子电渗方法导入皮肤的经皮转运情况^[110]。

参考文献

1. Webster's Seventh New Collegiate Dictionary; Merriam; Springfield, MA, 1971.
2. Flory, P. J. Discuss. Faraday Soc. 1974, 57, 7.
3. The United States Pharmacopeia 24/The National Formulary 19; Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, 2000; 2111-2112.
4. Peppas, N. A. Hydrogels in Medicine and Pharmacy; CRC Press; Boca Raton, FL, 1987; I.
5. Peppas, N. A. Hydrogels in Medicine and Pharmacy; CRC Press; Boca Raton, FL, 1987; II.
6. Peppas, N. A. Hydrogels in Medicine and Pharmacy; Peppas, N. A., Ed.; CRC Press; Boca Raton, FL, 1987; III.
7. Alger, M. S. M. Polymer Science Dictionary; Elsevier Applied Science; London, 1989; 69.



8. Gander, B.; Gurny, R.; Doelker, E.; Peppas, N. A. *Pharm. Res* 1989, 6, 578—584.
9. Bray, J. C.; Merrill, E. W. *J. Appl. Polym. Sci.* 1973, 17, 3779—3794.
10. Ofner, C. M., III; Bubnis, B. A. *Pharm. Res.* 1992, 13, 1821—1827.
11. Bryce, T. A.; McKinnon, A. A.; Morris, E. R.; Rees, D. A.; Thom, D. *Discuss. Faraday Soc.* 1974, 67, 331.
12. Rees, D. A. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1969, 24, 267.
13. deButts, E. H.; Hudy, J. A.; Elliot, J. H. *Ind. Eng. Chem.* 1957, 49, 94.
14. Nagy, M. *Colloid Polym. Sci.* 1985, 263, 245.
15. Vadnere, M.; Amidon, G.; Lindenbaum, S.; Haslam, J. L. *Int. J. Pharm.* 1984, 32, 207.
16. Grant, G. T.; Morris, E. R.; Rees, D. A.; Smith, P. J. C.; Thom, D. *FE. B. S. Lett.* 1973, 32, 1.
17. Noble, O.; Turquois, T.; Taravel, F. R. *Carbohydr. Polym.* 1990, 12, 203.
18. Laurent, T. C. *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix*; Balazs, E. A., Ed.; Academic Press: New York, 1970; 2, 703.
19. Tanaka, F. *Macromolecules* 1990, 23, 3790.
20. van Olphen, H. *An Introduction to Clay Colloid Chemistry*; Interface Publishers: New York, 1963; 67—68.
21. Schott, H. J. *Colloid Interface Sci.* 1968, 26, 133—139.
22. Barry, M. D.; Rowe, R. C. *Int. J. Pharm* 1989, 53, 139.
23. Tiemessen, H. L. G. M.; Bodde', H. E.; van Mourik, C.; Junginger, H. E. *Progr. Colloid Polym. Sci.* 1988, 77, 131.
24. Clark, A. H.; Ross-Murphy, S. B. *Adv. Polym. Sci.* 1987, 83, 57.
25. Eldridge, J. E.; Ferry, J. D. *J. Phys. Chem.* 1954, 58, 975.
26. Florence, A. T.; Atwood, D. *Physicochemical Principles of Pharmacy*; Chapman and Hall: New York, 282.
27. Florence, A. T.; Atwood, D. *Physicochemical Principles of Pharmacy*; Chapman and Hall: New York, 285.
28. Gibbs, D. A.; Merrill, E. W.; Smith, K. A.; Balazs, E. A. *Biopolymers.* 1968, 6, 777.
29. Barry, B. W. *Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption*; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1983.
30. Schott, H. *Rheology. Remington: The Science and Practice of Pharmacy*; Gennaro, A. R., Ed.; Mack: Easton, PA, 1995.
31. The United States Pharmacopeia 24/The National Formulary 19; Pharmacopeial Convention; Rockville, MD, 2000; 2049.
32. Stenzel, K. H.; Miyata, T.; Rubin, A. L. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1974, 3, 255.
33. Wallace, D. G.; Condell, R. A.; Donovan, J. W.; Paivinen, A.; Rhee, W. M.; Wade, S. B. *Biopolymers.* 1986, 25, 1875.
34. Miyata, T.; Rubin, A. L.; Stenzel, K. H.; Dunn, M. W. *U. S. Patent.* 4, 164, 559, 1979.
35. Vasanthra, R.; Sehgal, P. K.; Rao, K. P. *Int. J. Pharm.* 1988, 47, 95.
36. Veis, A. *Macromolecular Chemistry of Gelatin*; Academic Press: New York, 1964.
37. Ward, A. G.; Courts, A. *The Science and Technology of Gelatin*; Academic Press: New York, 1977.
38. Ofner, C. M., III; Schott, H. J. *Pharm. Sci.* 1986, 75, 790—796.
39. Ofner, C. M., III; Schott, H. J. *Pharm. Sci.* 1987, 76, 715—723.
40. Klech, C. M.; Li, X. J. *Pharm. Sci.* 1990, 79, 999.
41. Welz, M. M.; Ofner, C. M., III. *J. Pharm. Sci.* 1992, 81, 85—90.
42. Mwangi, J. W. *Ph. D. Dissertation*; University of the Sciences in Philadelphia; 2001.
43. Morris, V. J. *Gelation of Polysaccharides. Functional Properties of Food Macromolecules*; Mitchell, J. R., Ledward, D. A., Eds.; Elsevier Applied Science: London, 1986, 123.
44. Cottrell, I. W.; Kovacs, P. *Algin. Food Colloids*; Graham, H. D., Ed.; AVI: Westport, CT, 1977; 450.
45. Thomas, S. *Pharm. J.* 1985, 235, 188.
46. Julian, T. N.; Radehaugh, G. W.; Wisniewski, S. J. *J. Contr. Release* 1988, 7, 165.
47. Kaneko, K.; Kanada, K.; Oouchi, K.; Saito, N.; Ozeiki, T. *Arch. Pract. Pharm.* 1999, 59, 8—16.
48. Kennedy, J. F.; White, C. A. *Bioactive Carbohydrates in Chemistry, Biochemistry, and Biology*; Ellis Horwood: Chichester, UK, 1983; 163.
49. Morris, E. R.; Rees, D. A.; Robinson, G. R. *J. Mol. Biol.* 1980, 138, 349.
50. Morris, V. J.; Chilvers, G. R. *Carbohydr. Polym.* 1983, 3, 129.
51. Winstead, D. A. *Ph. D. Dissertation*; Philadelphia College of Pharmacy and Science; 1997.
52. Picker, K. M. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1999, 25, 339—346.
53. Balazs, E. A.; Band, P. *Cosmet. Toilet.* 1984, 99, 65.
54. Listrat, V.; Ayrat, X.; Patarnello, F.; Bonvarlet, J. P.; Simonnet, J.; Amor, B.; Dougados, M. *Osteoarthr. Cartilage* 1997, 5, 153—160.

55. Saettone, M. F.; Chetoni, P.; Torracca, M. T.; Burgalassi, S.; Giannaccini, B. *Int. J. Pharm.* 1989, 51, 203.
56. Gidley, M. J.; Morris, E. R.; Murray, E. J.; Powell, D. A.; Rees, D. A. *IBJM* 1980, 2, 332.
57. Sungthongjeen, S.; Pitaksuteepong, T.; Somsiri, A.; Sriamornsak, P. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1999, 25, 1271—1276.
58. Giunchedi, P.; Conte, U.; Chetoni, P.; Saettone, M. F. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1999, 9, 1—7.
59. Heckman, E. *Starch and its Modifications for the Food Industry*. Food Colloids; Graham, H. D., Ed.; AVI: Westport, CT, 1977; 478.
60. Rink, S. G.; Stainsby, G. *Prog. Food Nutr. Sci.* 1982, 6, 323.
61. Witschi, C.; Mrsny, R. J., *Pharm. Res.* 1999, 16, 382—390.
62. Foord, S. A. Ph.D. Dissertation; University of Bristol, 1980.
63. Franz, G. *Adv. Polym. Sci.* 1986, 76, 3.
64. Losse, G.; Muller, F.; Fischer, S.; Wunderlich, G.; Hacker, E. *Pharmazie* 1989, 44, 331.
65. Singh, K. K.; Deshpande, S. G.; Baichwal, M. R. *Indian Drugs* 1994, 31, 149—154.
66. Rozier, A.; Mazuel, C.; Grove, J.; Plazonnet, B. *Int. J. Pharm.* 1989, 57, 163.
67. Imai, T.; Sakai, M.; Ohtake, H.; Azuma, H.; Otagiri, M. *Pharm. Res.* 1999, 16, 80—89.
68. Segal, R.; Pisanty, S. *J. Clin. Pharm. Therm.* 1987, 12, 165.
69. Goldstein, A. M.; Alter, E. N. *Guar Gum*. In *Industrial Gums*; Whistler, R. L., Ed.; Academic Press: New York, 1959, 338.
70. Bamba, M.; Puisieux, F.; Marty, J. P.; Carstensen, J. T. *Int. J. Pharm.* 1979, 2, 307.
71. Gliko-Kabir, I.; Yagen, B.; Penhasi, A.; Rubinstein, A. *Pharm. Res.* 1998, 15, 1019—1025.
72. Meer, W. A. *Plant Hydrocolloids*. Food Colloids; Graham, H. D., Ed.; AVI: Westport, CT, 1977; 527.
73. Mullet, T.; Hakert, H.; Eckert, T. *Colloid Polym. Sci.* 1989, 267, 230.
74. Greminger, G. K.; Savage, A. B. *Methylcellulose and its Derivative*. Industrial Gums; Whistler, R. L., Ed.; Academic Press: New York, 1959; 665.
75. The Effect of Sodium Carboxymethylcellulose Gel in Patients with Nonhealing Lower Extremity Diabetic Ulcers, American College of Surgeons, Chicago, IL October, 13, 1997.
76. Kibbe, A. H. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*; American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Press (London): Washington, DC, 2000; 244—248.
77. Alvarez-Lorenzo, C.; Gomez-Amoza, J. L.; Martinez-Pacheco, R.; Souto, C.; Concheiro, A. *Int. J. Pharm.* 1999, 180, 91—103.
78. Kibbe, A. H. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*; American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Press (London): Washington, DC, 2000; 252—255.
79. Mitchell, K.; Ford, J. L.; Armstrong, D. J.; Elliot, P. N.; Rostron, C. *Int. J. Pharm.* 1993, 100, 165—173.
80. Greminger, G. K.; Savage, A. B. *Methylcellulose and its Derivative*. Industrial Gums; Whistler, A. L., Ed.; Academic Press: New York, 1959, 579.
81. Kubis, A.; Dybek, K.; Krutul, H. *Pharmazie* 1987, 42, 519.
82. Zhou, M.; Donovan, M. D. *Int. J. Pharm.* 1996, 135, 115—125.
83. Kibbe, A. H. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*; American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Press (London): Washington, DC, 2000; 79—82.
84. Barry, B. W.; Meyer, M. C. *Int. J. Pharm.* 1979, 2, 1.
85. Penn, L. E. *Gel Dosage Forms: Theory, Formulation, and Processing*. Topical Drug Delivery Formulations; Osborne, D. W., Amann, A. H., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1990; 381—338.
86. Ostrenga, J.; Steinmetz, C.; Poulsen, B. *J. Pharm. Sci.* 1990, 79, 1175—1179.
87. Lochhead, R. Y.; Hemker, W. J.; Castarieda, J. Y. *Cosmet Toilet.* 1987, 120, 89.
88. Shin, S. C.; Kim, J. Y.; Oh, I. J. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2000, 26, 307—312.
89. Rossi, S.; Bonferoni, M. C.; Ferrari, F.; Caramella, C. *Pharm. Dev. Tech.* 1999, 4, 55—63.
90. Bonferoni, M. C.; Rossi, S.; Ferrari, F.; Caramella, C. *Pharm., Dev. Tech.* 1999, 4, 45—53.
91. Chen-Chow, P. C.; Frank, S. G. *Int. J. Pharm.* 1981, 8, 89.
92. Attwood, D.; Collett, J. H.; Tait, C. J. *Int. J. Pharm.* 1985, 26, 25.
93. Nalbandian, R. M.; Henry, R. L.; Balko, K. W.; Adams, D. V.; Neuman, N. R. *J. Biomed. Mater. Res.* 1987, 6, 1135.
94. Miller, S. C.; Donovan, M. D. *Int. J. Pharm.* 1982, 12, 147.
95. Tomida, H.; Shinohara, M.; Kuwada, N.; Kiryu, S. *Acta Pharm. Suec.* 1987, 24, 263.

96. Barichello, J. M.; Morishita, M.; Takamyam, K.; Nagai., T. *Int. J. Pharm.* 1999, 184, 189—198.
97. Saettone, M. F.; Giannaccini, B.; Guiducci, A.; Savigni, P. *Int. J. Pharm.* 1986, 31, 261.
98. Hussain, M. D.; Rogers, J. A.; Mehvar, R.; Vucathala, G. K. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1999, 25, 265—271.
99. Chen, L. L. *Pharm. Dev. Tech.* 1998, 3, 241—249.
100. Molyneus, P. *Water-Soluble Synthetic Polymers and Behavior*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1983; I, 122.
101. Pritchard, J. G. *Polyvinyl Alcohol: Basic Properties and Uses*; MacDonald Technical and Scientific: London, 1970.
102. Morimoto, K.; Nagaysau, A.; Fukanoki, S.; Morisaka, K.; Hyon, S.; Ikada, Y. *Pharm. Res.* 1989, 6, 338.
103. Wang, N.; Wu, X. S.; Li, J. L. *Pharm. Res.* 1999, 16, 1430—1435.
104. Quintanar-Guerrero, D.; Ganem-Quintanatar, D.; Raygoza-Trejo, D.; Doelker, E. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1999, 25, 169—175.
105. Nairn, J. G. *Solutions, Emulsions, Suspensions, and Extracts*. Remington: The Science and Practice of Pharmacy; Gennaro, A. R., Ed.; Mack: Easton PA, 2000, 1515—1518.
106. Shah, D. N.; White, J. L.; Hem, S. L. *J. Pharm Sci.* 1981, 70, 1101.
107. Neumann, B. S.; Sansom, K. G. *J. Soc. Cosm. Chem.* 1970, 21, 237.
108. Shrivastava, R.; Jain, S. R.; Frank, S. G. *J. Pharm. Sci.* 1985, 74, 214.
109. Ritschel, W. A.; Ritschel, G. B.; Sathyan, G. *Res. Commun. Pathol. Pharmacol.* 1988, 62, 103.
110. Szan, A.; Papp, L. *J. Control. Rel.* 1998, 56, 239—247.

参 考 书 目

- Drug Facts and Comparisons. In *Facts and Comparisons*; St. Louis MO, 2000.
- Graham, H. D. *Food Colloids*; AVI: Westport, CT, 1977.
- Kennedy, I. F.; White, C. A. *Bioactive Carbohydrates in Chemistry, Biochemistry, and Biology*; Ellis Horwood Limited: Chichester UK, 1983.
- Kibbe, A. H. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*; American Pharmaceutical Association and The Pharmaceutical Press (London): Washington DC, 2000.
- Mitchell, J. R.; Ledward, D. A. *Functional Properties of Food Macromolecules*; Elsevier Applied Science: London, 1986.
- Physicians' Desk Reference for Nonprescription Drugs; Medical Economics Company Inc. Oradell NJ, 1998.
- Physicians' Desk Reference; Medical Economics Company: Oradell NJ, 2001.

(罗华菲 译)



N

凝聚和相分离

Bruno Gander*Institute of Pharmaceutical Sciences, Zürich, Switzerland***M. J. Blanco-Prieto***Universidad de Navarra, Pamplona, Spain***C. Thamasin***The R. W. Johnson Pharmaceutical Research Institute, Schaffhausen, Switzerland***Ch. Wandry****D. Hunkeler***Laboratoire des Polyélectrolytes et BioMacromolécules, Lausanne, Switzerland*

引言

聚合物凝聚法是一种具有很长历史的且广泛应用的方法，常用于液态或固态药物或者细胞等生物材料的可逆性凝胶化或者微囊化。国际纯粹与应用化学联合会（IUPAC）把凝聚法定义为一种用于把胶体体系分离为两个液相体系的方法。该法被认为是和沉淀法不同的方法，后者通常是指发生在不稳定的胶体体系中的凝结或者絮凝^[1]。凝聚法（coacervation）这个概念最早是由 Bungenberge de Jong 和 Kruyt 于 1929 年提出的，用来指一种由于状态的热力学条件改变使得水性的胶体溶液发生分离，产生其中一个富含胶体（如凝聚层）而另一个含有很少胶体的两个液相的过程^[2]。根据不同的相分离机制，凝聚可以分为简单的、复杂的凝聚。在简单的凝聚中，聚合物通常被如硫酸钠等电解质从溶液中盐析出来，或者是由于在溶液中添加乙醇等与水互溶的非溶剂的去溶剂化作用，以及改变温度等作用析出来；相反，复杂的凝聚是由带相反电荷的聚合物之间的相互引力作用来实现的。

凝聚法最早是由 National Cash Register Company 于 20 世纪 50 年代末应用于商业上的，用来开发“无碳的”碳复印纸^[3]。最近，聚合物凝聚领域得到了长足地发展，出现了凝聚系统更加精细和完整的分类（表 1）。其他的用于微囊化的凝聚法的分类方法和相关的原理也有不少文献以实例来进行阐述^[4~6]。

在本章中，我们将凝聚作为溶剂中的一种或两种高分子之间的现象进行讨论，虽然相同的现象也可能存在于肝素阴离子、庆大霉素或者吗啡阳离子等离子型或强极性的药物之间，胆酸、十二烷基磺酸钠等阴离子表面活性剂和某些带正电荷的抗抑郁药之间^[7]，以及在硫酸根离子存在时的带阴离子的 DNA 和带正电荷的明胶、壳聚糖之间^[8]。更进一步说，类似于凝聚的现象也正在越来越广泛地应用于“智能”高分子之中，这些高分子可以由一些很小的诸如 pH、温度和离子强度等环境的变化引起可逆的构型上的或者宏观上的变化^[9]。这些聚合物在本质上是聚离子的单体或者缔合物，常用于环境敏感型的药物输送、生物分离、生物传感器或者具有疏水/亲水可转换的表面的材料。

表 1 常见的聚合物凝聚的水系统和有机系统的分类

二元系统：通过部分聚合物去溶剂而凝聚	
溶剂（组分 1） ¹⁾	水；有机溶剂
聚合物（P；组分 2） ¹⁾	亲水性 ²⁾ P ⁰ , P ⁺ , P ⁻ ；亲脂性 P
凝聚形成因素	温度, pH
三元系统：通过部分聚合物去溶剂而凝聚	
溶剂（组分 1） ¹⁾	水；有机溶剂
聚合物（P；组分 2） ¹⁾	亲水性 ²⁾ P ⁰ , P ⁺ , P ⁻ ；亲脂性 P
凝聚剂（组分 3） ¹⁾	聚合物的非溶剂；电解质（“简单凝聚”）
三元系统：通过聚合物 2-聚合物 3 排斥而凝聚	
溶剂（组分 1） ¹⁾	水；有机溶剂
聚合物（P2；组分 2） ¹⁾	亲水性 ²⁾ P2 ⁰ , P2 ⁺ , P2 ⁻ ；亲脂性 P2
凝聚剂（组分 3） ¹⁾	聚合物 3, P3

续表

四元系统：通过聚合物 2-聚合物 3 排斥而凝聚	
溶剂 (组分 1) ¹⁾	水 ³⁾
聚合物 (组分 2) ¹⁾	P ⁺ 或 P ⁻
交联剂 (组分 3) ^{1), 4)}	P ⁻ 或 P ⁺ (“复杂凝聚”)；二价和三价反阳离子或反阴离子

1) 组分：1 为聚合物凝聚的溶剂；2 指凝聚的聚合物；3 指凝聚剂。方程中也可将该数字标为下标。

2) P⁰, P⁺, P⁻ 分别指非离子、阳离子和阴离子聚合物。

3) 非水系统在制药技术中没有描述。

4) P⁻ 和 P⁺ 或二价和三价反离子为凝聚相的集成组分。

根据本章对于凝聚法的分类 (表 1)，聚合物凝聚通常可以在水性或有机溶液中、二元或三元体系中观察到。这些体系的凝聚过程有 3 种主要的机理：①在二元或三元体系中聚合物的去溶剂化作用；②在一种相同的溶剂中的两种不同性质的聚合物：聚合物 2 和聚合物 3 之间的相互排斥作用，如在三元体系中；③聚离子化合物和对应的聚反离子化合物之间的相互作用，如在三元体系中相同溶剂中的聚阳离子化合物和聚阴离子化合物之间的相互作用、聚氢离子供体化合物和聚氢离子受体化合物之间的相互作用均可以导致聚合物凝聚。因此，聚合物凝聚是聚合物-聚合物 (同类的)、聚合物-溶剂、聚合物-凝聚剂或者聚离子化合物-聚反离子化合物等分子之间互相作用的直接结果。在更加详细地考查各种体系之前掌握一些聚合物溶液性质的基础知识，对于理解凝聚或者基于聚合物相分离的微囊化工艺的优化是大有裨益的。

溶解在溶剂中的聚合物被一圈溶剂分子包裹着，溶剂通常通过氢键或范德华力将聚合物的官能团溶剂化。溶剂化层的包裹作用阻止了链片段之间通过氢键、范德华力及离子键的作用相互接近。相邻链片段之间互相吸引的价键力等次级作用力能通过影响使溶剂化层变薄来降低溶剂化的包裹作用，进而形成互相纠缠的网状结构，甚至形成非共价力的、弱的交联结构。聚合物链的去溶剂化是产生相分离的一种机制；在某些情况下却是产生凝胶化作用而不是相分离作用。降低溶剂化作用的因素包括：温度的变化、相对分子质量的增加、对于聚离子化合物来说二元体系中 pH 的变化、二元或三元体系中聚合物浓度的变化。一个非常有效提高聚合物溶液浓度的方法是降低可供聚合物溶剂化的溶剂分子数。在实际操作中，还可以在聚合物溶液 (三元体系) 中加入诸如电解质或者第二种聚合物的非溶剂。此处所指的非溶剂是对于要凝聚的聚合物溶解性能很差的所有溶剂。电解质或非溶剂的加入可以结合一部分聚合物的溶剂。这种对于溶剂化溶剂的竞争作用将导致聚合物分子去溶剂化作用，使得以凝聚或沉淀的方式产生相分离。当电解质用于聚合物的去溶剂化时，这种现象称为盐析现象。在水性体系中，脱水的有效性，即特定形式的去溶剂化作用，遵循所谓 Hofmeister 或易溶顺序，即按照对胶体体系盐析能力从小到大的对电解质的排列：NH₄⁺ < K⁺ < Na⁺ < Ca²⁺ < Mg²⁺ 和 Cl⁻ < 乙酸根 < SO₄²⁻ < 酒石酸根 < HPO₄²⁻ < 枸橼酸根 (这里只是列举了药剂中常应用的一

些例子)。

只有当至少有两种不同的非离子、非极性物质或者弱极性的聚合物 (聚合物 2 和聚合物 3) 在一个共同的溶剂中混合才会产生相分离的情况。这个过程是一个热力学控制的过程，可以用下面的理论来解释^[10]。聚合物在溶剂中溶解的过程通常是一个吸热的过程 (其混合焓是正的， ΔH_m)，因此会阻碍溶解。要使聚合物溶解，需要熵的增加 (ΔS_m 为正)，比如说，由于聚合物的分子链在溶液中需要较大的摩尔体积，所以聚合物的溶解过程会干扰溶剂的排列 (或者说晶格的破坏)，这将导致熵的增加。当第二种聚合物 (聚合物 3) 加至含有聚合物 2 的相同溶剂的溶液中，这两种聚合物将主要通过范德华力相互作用，这种作用与其相对分子质量成正比。这种相互作用将会产生实际上为吸热的能量变化，而这种通过互相混合产生的焓的增加由于只有一小部分聚合物分子参与所以显得十分小。因此，由于不同的聚合物互相混合会导致自由能的增加，体系会产生两个不同的相，其中每一个相都含有较多的热力学相对更稳定的一种聚合物。

和前面提到的机制相反，带有相反电荷的聚离子对，或者可以高度极化的聚合物对，或者聚离子给体和聚离子受体对，可以很好地相互作用，因为负的 ΔH_m 引起的自由能是负的。因此，它们可以在共同的溶剂中共存，甚至它们之间的相互作用强到负的 ΔH_m 可以超过它们在共同的溶剂中得到的熵值。在这种情况下，两种聚合物就形成复合物从溶剂中析出。聚合物复合物可以以固体颗粒形式沉淀下来，也可以保持部分的溶解状态 (复合物凝集)，这取决于聚合物复合物和溶剂互相作用的焓的大小。聚离子化合物和低相对分子质量的二价或三价反离子混合，如 Ca²⁺、Mg²⁺、Al³⁺、Zn²⁺、二价的酒石酸阴离子等，聚合物链可以形成强的非共价键的交联，从而形成相对紧密的网状结构，这也是一种机制。

通常，聚合物凝聚的所有机理都涉及某种相分离，因此可以产生一定密度的凝聚微粒。这些微粒可以包含一定的附加成分，如溶解的药物或固体表面的沉积物，后者通常用于加入体系中固体粒子的包衣，如药物颗粒或活的细胞。

聚合物溶解度和相分离的热力学模型

凝聚法的基本方面长时间来已经被经典的研究所彻底



覆盖,如 Bungenberg de Jong 和 Kruyt 对于离子体系的凝聚的研究^[2]以及 Dobry 等对非离子体系的研究^[11]。聚合物-溶剂的相互作用和聚合物相分离的基本的热力学条件也已经由 Flory 进行了很好的阐述^[10]。在本章以下部分,将从机械和热力学的角度简单介绍一下聚合物的相分离过程。

1. 用于描述由温度变化和添加非溶剂引起凝聚的经典模型

在 20 世纪 40 年代初期,Flory 和 Huggins 分别提出了用于描述聚合物溶液的晶格模型,并引入了互相作用的参数 χ ^[10]。这个参数随着溶剂溶解能力的下降而增加,因此,热力学上的良溶剂的相互作用参数较小。在实践中,大多数的聚合物-溶剂组合的 χ 值为 0.2~0.6^[12]。并且,该理论预测只要相互作用参数小于临界值 (χ_c),聚合物就可以溶解于某溶剂中,而在指定的温度下临界值取决于溶解的聚合物的聚合度 (χ)^[10]:

$$\chi_c \approx \frac{1}{2} + \frac{1}{\sqrt{\chi}} \quad (1)$$

对于高相对分子质量的聚合物, χ_c 接近于 0.5。逐渐加入非溶剂 (χ 值较大),相分离依 χ 减小的顺序产生,此时, $\chi < \chi_c$ 。此外, χ 还取决于温度,这个经常会用溶解度的相图表示,这种相图描述了单相或双相体系与聚合物体积分数及温度的关系。 χ 在凝聚的应用是非常有限的,因为 χ 不是一个常量,取决于聚合物的浓度、相对分子质量和温度;并且,聚合物-溶剂对的 χ 很难测定,而且对于多组分体系测定 χ 也不方便;最后, χ 作为一个复合值还受氢键的影响。

更加常用的是用于描述聚合物溶解度的溶解度参数,它最早由 Hildebrand 和 Scott^[13] 应用于描述弥散的相互作用力的大小,后来 Hansen 进行了延伸^[14],用弥散度 (δ_d)、极性 (δ_p) 和氢键 (δ_h) 来描述对相互作用能的贡献。常用于估算聚合物 2 在溶剂 (下标为 1) 的溶解度范围的公式为

$$\delta = [4(\delta_{d1} - \delta_{d2})^2 + (\delta_{p1} - \delta_{p2})^2 + (\delta_{h1} - \delta_{h2})^2]^{0.5} \quad (2)$$

根据 Van Krevelen 的理论^[15],聚合物要有良好的溶解度, $\Delta\delta$ 最大不应该超过 5MPa^{0.5}。这个规律可以应用于具有恒定浓度的聚合物溶液。然而,如果逐渐添加非溶剂,溶剂会在凝聚相和连续液体间分配,凝聚相的组成会发生逐渐的改变。假设连续相只有溶剂和非溶剂,凝聚相为溶剂和聚合物,两个相的溶解度参数可以用以下公式计算:

$$\delta_{\text{连续相}} = \phi_{1,\text{连续相}} \delta_{\text{溶剂}} + \phi_{3,\text{非溶剂}} \quad (3)$$

$$\delta_{\text{凝聚相}} = \phi_{1,\text{凝聚相}} \delta_{\text{溶剂}} + \phi_{2,\text{聚合物 2}} \quad (4)$$

式中: $\phi_{1,\text{连续相}}$ 、 $\phi_{1,\text{凝聚相}}$ 、 ϕ_2 和 ϕ_3 分别表示连续相中溶剂的体积分数、凝聚相中溶剂的体积分数、聚合物和非溶剂的体积分数。虽然式 (3) 和式 (4) 只是经验公式,有效性受到限制,但是在制药技术上常用来改善包衣液的溶剂混合、膜的形成和微囊化。如果非溶剂在聚合物溶液中可以溶解的话,只对于单相的体系可以计算出凝聚相的平均溶解度系数。由于聚合物的溶解度参数不能直接从蒸发能计

算出来,从官能团的黏结性以及假定这些性质可以加和等方面,人们提出了很多的计算方法^[16]。而且,可以用已知溶解度参数的多种不同的溶剂来区分聚合物凝聚的良溶剂和不良溶剂。

2. 用互相作用参数 χ 来描述聚合物 2-聚合物 3 之间排斥引起的凝聚

理论上对于基于聚合物-聚合物排斥导致的聚合物相分离,需要把 χ 参数的概念推广到在同一个溶剂体系中的两个聚合物之中。在这种情形下, Scott^[17] 定义了相分离的临界条件为 $|\chi_{1,2} - \chi_{1,3}| \ll 1$, 且 $\sqrt{\chi_2} < \sqrt{\chi_3} < \chi_2 \dots$

$$(\chi_c)_{2,3} = 0.5 \left(\frac{1}{\sqrt{\chi_2}} + \frac{1}{\sqrt{\chi_3}} \right) \left(\frac{1}{\sqrt{1-\phi_1}} \right) \quad (5)$$

式中,下标 1、2 和 3 分别代表溶剂、凝聚的聚合物 (聚合物 2) 和第二种聚合物 (聚合物 3; 凝聚剂)。如果聚合物 2-聚合物 3 之间的相互作用参数 $\chi_{2,3}$ 从试验估计的或者从官能团的贡献计算得出的溶解度参数近似得到 [式 (6)]:

$$\chi \approx \frac{V_1}{RT} (\delta_2 - \delta_3)^2 \quad (6)$$

这样,溶剂 (ϕ_1) 和两种聚合物 (ϕ_2 , ϕ_3) 的临界体积分数就可以通过以下公式计算出来了:

$$\frac{\phi_2}{1-\phi_1} = \frac{\sqrt{\chi_2}}{\sqrt{\chi_2} + \sqrt{\chi_3}} \quad (7)$$

$$\frac{\phi_3}{1-\phi_1} = \frac{\sqrt{\chi_3}}{\sqrt{\chi_2} + \sqrt{\chi_3}} \quad (8)$$

除非两个聚合物的溶解度参数非常接近,如果 $\chi_{2,3} > (\chi_c)_{2,3}$, 聚合物将因不相容而产生相分离。

3. 用于描述聚合物凝聚的新方法

另外一个用来描述聚合物凝聚的有意思的方法是 Van Oss 提出来的^[18],他用界面间相同或不同分子之间的相互作用情况定义了简单凝聚和复杂凝聚的条件。在这个模型里,聚合物 2 在一种溶剂 (下标为 1) 里的溶解度 s 取决于界面相互作用的自由能 ΔG_{212} :

$$RT \ln s = f(G_{212}^F) \quad (9)$$

根据这个公式,液相中的聚合物分子的溶解度会随着正的 ΔG_{212}^F 的值的增加而增加,因为这样,聚合物分子之间互相排斥也增加了,从而使弥散度得以增加。如果 $\Delta G_{212}^F < 0$,溶解度会随着分子之间的相互吸引而下降。在大多数制剂体系中, ΔG_{212}^F 主要由分子的非极性的 Lifshitz-van der Waals 力 (ΔG_{212}^W) 以及 Lewis 酸/碱作用 (ΔG_{212}^A) 构成。 ΔG_{212}^F 可以用下式表示:

$$G_{212}^F = -2(\sqrt{\gamma_2^W} - \sqrt{\gamma_1^W})^2 - 4(\sqrt{\gamma_2^A} \gamma_2^B + \sqrt{\gamma_1^A} \gamma_1^B - \sqrt{\gamma_2^A} \gamma_1^B - \sqrt{\gamma_2^B} \gamma_1^A) \quad (10)$$

这个公式右侧的后半部分描述了 Lewis 酸/碱作用。如

果在一个三元体系中,两个不同的聚合物 2 和聚合物 3 溶于同一个溶剂 1 中,则 ΔG_{213}^F 可以表示为

$$\begin{aligned} G_{213}^F = & (\sqrt{\gamma_2^W} - \sqrt{\gamma_3^W})^2 - (\sqrt{\gamma_2^W} - \sqrt{\gamma_1^W})^2 \\ & - (\sqrt{\gamma_3^W} - \sqrt{\gamma_1^W})^2 \\ & + 2\sqrt{\gamma_1^+}(\sqrt{\gamma_2^+} + \sqrt{\gamma_3^+} - \sqrt{\gamma_1^+}) \\ & + 2\sqrt{\gamma_1^-}(\sqrt{\gamma_2^-} + \sqrt{\gamma_3^-} - \sqrt{\gamma_1^-}) \\ & - 2\sqrt{\gamma_2^+ \gamma_3^+} - \sqrt{\gamma_2^- \gamma_3^-} \end{aligned} \quad (11)$$

对于所有的仅有 Van der Waals 作用力的体系,液相中聚合物 2 和聚合物 3 界面作用能减小为

$$G_{213}^F = \gamma_{23}^{LW} - \gamma_{21}^{LW} - \gamma_{31}^{LW} \quad (12)$$

可以改写为

$$G_{213}^F = (\sqrt{\gamma_2^{LW}} - \sqrt{\gamma_1^{LW}})(\sqrt{\gamma_1^{LW}} - \sqrt{\gamma_3^{LW}}) \quad (13)$$

在由聚合物 2-聚合物 3 排斥引起的凝聚过程中,凝聚的条件为 $\Delta G_{213}^F > 0$,在非极性体系中,当 $\gamma_2^W > \gamma_1^W > \gamma_3^W$ 或 $\gamma_2^W < \gamma_1^W < \gamma_3^W$ 时,该条件可以得到满足。然而在极性系统中,凝聚只能由式(11)预测。与简单凝聚不同,四元体系中的复杂凝聚只有当聚合物分子相互吸引才会发生,因而界面自由能为负。

Van-Oss 理论的明显优势在于可以获得表面张力参数,对于给定的溶质, γ_2 可以通过接触角和 Young 方程确定。此外,这些参数还可通过 Van Krevelen 描述的聚合物官能团贡献理论上得到^[15]。另外,对于氢键起重要作用的系统, Van-Oss 模型是否有效还有疑问,因为界面张力的测定不能说明氢键作用力。

部分聚合物去溶剂导致的 聚合物凝聚(简单凝聚)

1. 过程描述

简单聚合物凝聚是基于二元或三元体系的聚合物去溶剂化。部分聚合物的去溶剂化可以通过改变聚合物溶液温度、在聚合物溶液中加入一种难溶性溶剂(或非溶剂),或者通过电解质的“盐析”来实现。凝聚相可能在搅拌的平衡相中形成液滴或者在给定的固体或液体表面沉积成膜,如固体药物颗粒或者药物水溶液的液滴。在这两种情况下,凝聚物通过分子间物理作用或共价交联而稳定,这种稳定性可以通过改变 pH 或温度或者加入交联剂而实现^[19]。在制剂技术中,简单凝聚,与其他类型的聚集一样,经常用于包裹药物制成微囊或者微骨架,这两种微粒可以称之为微球。如果要将一种药物包裹在凝聚的聚合物中,就将该药物的固体或液体形式溶解或分散在聚合物溶液中。因此,两种常用的聚合物可以用来阐述简单聚合的原理。

常见的简单凝聚过程多用明胶。明胶的简单凝聚通常采用与能够水相溶的非溶剂,如乙醇或盐,如硫酸钠。这样明胶分子在高于凝胶点的温度下部分去溶剂化,从而导致富含明胶的液体相与含少量明胶的饱和溶液分离(图 1)。最后,

凝聚液滴在饱和溶液中通过物理或者共价交联而硬化(例如,通过调整等电点的 pH,或者加入戊二醛或甲醛)。

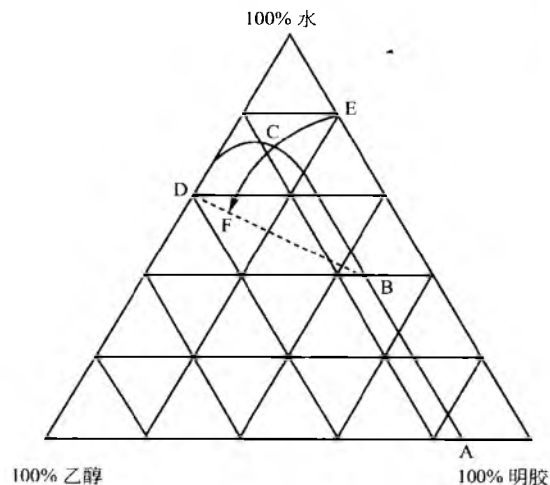


图 1 明胶-水-乙醇的三元相图。图示两相共存区域,即凝聚相和平衡相。双曲线下的区域表示两相系统(点 A、B、C、D),双曲线上方的区域代表明胶溶于水-乙醇混合物的单相系统。箭头(点 E、C、F)表示在初浓度为 20%明胶溶液中的加入乙醇。大约乙醇浓度达到 18%时发生相分离(点 C)。在给定组成(点 F),两相由点 D(40%乙醇和 60%水的平衡相)和点 B(凝聚相组成约为 46%的明胶, 15%的乙醇和 39%的水)组成所谓连接线(虚线)的两边。平衡相和凝聚相的比值,按质量计算,由 D-F/F-B 的比值给出

常用于简单凝聚的聚合物有纤维素衍生物,特别是乙基纤维素(EC)^[20]。几乎所有的纤维素醚都是水溶性的,EC 和纤维素酯类是不溶于水或者是部分溶于水的,其溶解度与 pH 有关。对于 EC 的凝聚,甲苯是首选的良溶剂而环乙烷是不良溶剂^[21~23]。在 EC 溶液中逐渐加入环乙烷会引起聚合物去溶剂化。另外,EC 可以溶于热环乙烷中,逐渐冷却至室温会产生相分离。在这两种情况下,凝聚膜或液滴可以在大体积的环乙烷中硬化,从而形成物理交联。

2. 材料

明胶^[24,25]和纤维素衍生物^[26,27]是在制剂中最常用于简单凝聚的聚合物,尽管其他聚合物也可以成功用这种方法制备微囊。原则上,只要聚合物可以实现部分去溶剂化,那么这种聚合物就可以用来作为囊材。

用于简单凝聚的聚合物包括聚苯乙烯、聚乙酸乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯酯^[5]、聚乙烯醇^[28]、聚丙烯酸酯^[29]、壳聚糖/PVA-混合物^[30,31]、白蛋白^[32]、酪蛋白^[33],以及蔬菜蛋白如豌豆球蛋白^[34]和豆球蛋白^[35]。建议读者参阅该领域的综述^[5,6,36,37],以获得更详细的信息。

在水溶液体系中加入非溶剂引起简单凝聚,乙醇、丙酮、二氧六环、异丙醇和丙醇等都是引起聚合物去溶剂化和相分离首选的溶剂。在有机体系中主要的非溶剂有石油醚、环乙烷和液体石蜡等。

3. 关键步骤和产品特性

简单凝聚包含 4 个主要步骤：①聚合物去溶剂化的相分离；②形成液滴或凝聚物在给定表面沉积；③凝聚相固化；④微粒或表面包衣材料的分离。凝聚是非常复杂的物理-化学现象，许多因素都会影响最后产品的性质。有机及水溶液体系的简单凝聚取决于给定温度下材料的分子间相互作用力，还有是否存在对凝聚相有高亲和性的固体或液体表面，以及聚合物去溶剂化速率和流体动力学过程，如扩散、层流和湍流运动。因此，在任何体系中，应当仔细研究材料和工艺参数来完全控制该过程。整体来说，简单凝聚是个相对较慢的过程，组分在分离相之间的扩散和分配可能需要很长时间才能达到平衡。因此，这个过程通常发生在非平衡条件下。这使得每一工艺步骤的速率和持续时间对于获得重现性的产品和防止不必要的凝聚和沉淀非常关键。所有的问题，与对有机溶剂和有毒关键交联剂的大量需求将会阻碍这种工艺进入工业生产领域。

4. 应用

正如我们所知，简单凝聚主要是作为学术界描述技术用于研究而不是制药工业。Green^[38]最先描述了明胶简单凝聚用于包裹油滴。在该研究中，钠或硫酸铵引发明胶凝聚。从那以后，简单凝聚法就用于包裹食品、矫味剂和药物^[19]。

纤维素衍生物的简单凝聚法可以用来包裹各种药物，如茶碱^[27]、布洛芬^[39]、吡哌美辛^[26]、阿霉素^[40]和尼卡地平^[41]。这些药物微囊包裹的目的是减少胃刺激，隐藏不良味道，更重要的是达到缓释目的。

三元体系中聚合物 2-聚合物 3 排斥引起的凝聚

1. 过程描述

聚合物 2-聚合物 3 排斥引起的凝聚中，聚合物 3 的添加可以引起溶于共溶剂 1 的两种聚合物的相分离。这种相分离会产生黏稠的聚合物 2 的液相，即凝聚物，以及聚合物 3 的低黏度相，通常称为连续或不良聚合物相。在搅拌作用下，凝聚物的液滴形成并分散于连续相中。聚合物 3 在溶剂 1 中的溶解度应比聚合物 2 在此共溶剂中的溶解度要好。对于颗粒产品，聚合物 3 应该作为凝聚物液滴的稳定剂以防止聚集。另外，对于包裹生物活性材料而言，凝聚物对囊核应当有一定的流动性和高亲和性，而囊核对连续相的亲合性应当较低（见下文）。最后，凝聚液滴仍因含大量溶剂 1 较软而很难分离。在凝聚物液滴可作为分离的微球或微囊收集之前加入硬化剂使凝聚物液滴固化。制备该凝聚工艺制备聚合物颗粒的典型实验过程见图 2。

2. 材料

多种聚合物可以用于聚合物 2-聚合物 3 相互排斥引起

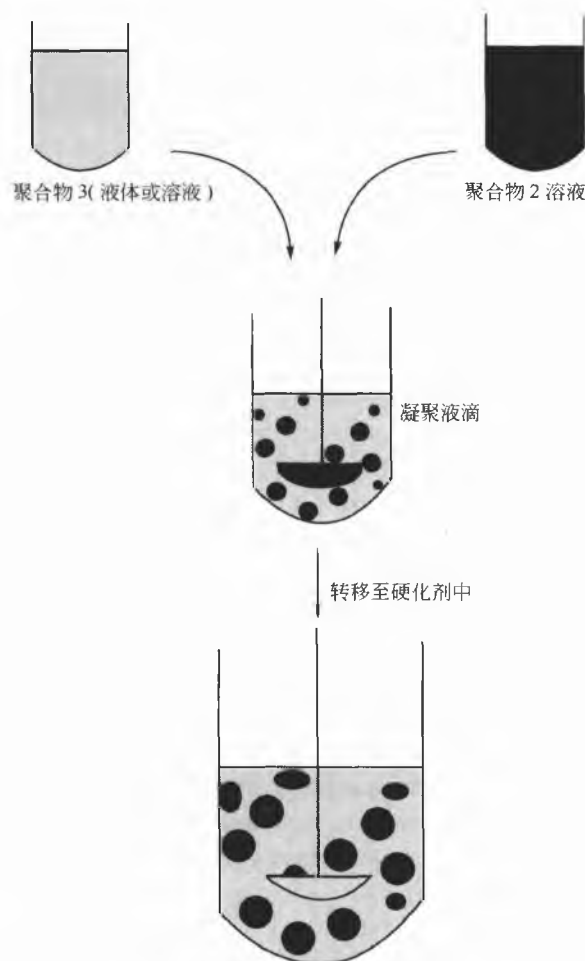


图 2 聚合物 2-聚合物 3 排斥凝聚工艺的实验过程

凝聚的方法，其中可生物降解的聚丙交酯（PLA）和丙交酯-乙交酯共聚物（PLGA）已经用于药物微囊化和药物控释最引人关注^[42]。PLA/PLGA 可以溶于二氯乙烷或乙酸乙酯，加入另一种相对分子质量较低的聚合物如硅油（聚二甲基硅醚，PDMS）（100~1000mPa·s）就可以发生凝聚。对于凝聚液滴的硬化，凝聚体混合物被转移到聚合物 2 的非溶剂中，如己烷、庚烷，或者低相对分子质量环硅醚[如八甲基环四硅氧烷（OMCTS）或十甲基环戊硅氧烷（DMCPS）]等。

能够用此工艺形成凝聚微粒的其他类型的聚合物很少，如乙基纤维素、硝基纤维素、聚甲基丙烯酸甲酯、邻苯二甲酸醋酸纤维素、丙烯腈-苯乙烯共聚物和聚苯乙烯^[4]。这些聚合物中，液态聚丁二烯（8~10kDa）可以作为凝聚剂。

凝聚液滴的硬化可以由凝聚聚合物随后的去溶剂化及形成范德华键或共价交联而实现^[4]。在第一个工艺中，凝聚体混合物转移至聚合物 2 的非溶剂中，该溶剂对于聚合物 3 却是良溶剂。这些硬化剂包括己烷、庚烷、极低相对分子质量的挥发性氧烷（OMCTS，DMCPS）。在化学硬化过程中，加入交联剂（如戊二醛或二异腈）而硬化。聚合物 2 交联的典型功能团是羟基，如纤维素醚和酯类中的羟基和氨基。

很自然,在前面提到的聚合物中加入一种非溶剂(例如,己烷、庚烷、液体石蜡或植物油)也可以去溶剂化而发生凝聚。聚合物 2-聚合物 3 排斥凝聚的优点是,通过控制聚合物 3 的加入量可以控制凝聚相的黏度和体积分数以及凝聚液滴的稳定性^[43]。凝聚物性质的控制对于防止凝聚体聚集及保持生物活性材料的有效包裹很重要。

3. 关键步骤与产品特性

聚合物 2-聚合物 3 排斥得到凝聚体的典型特征是加入少量聚合物 3 后即发生相分离,这与聚合物去溶剂化不同^[44]。在第一步中,聚合物 3 在聚合物 2 中形成分散相(图 3),随着聚合物 3 的加入产生相转化,聚合物 2 相(凝聚体液滴)分散在聚合物 3 中。继续加入聚合物 3,溶剂由凝聚液滴中部分提取出来,从而增加了黏度及防止聚集的物理稳定性。凝聚体的最优稳定性一般当聚合物 3 体积分数在一定范围内时得到。这个“稳定窗”由不同的研究者用不同类型的 PLA 和 PLGA 进行了测定^[43]。

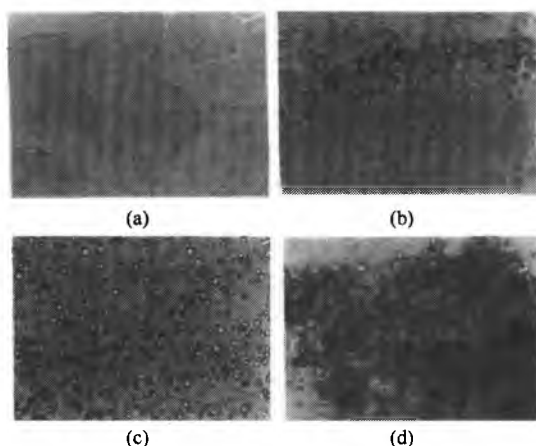


图 3 PLA-硅油 (PDMS) 在二氯甲烷 (DCM) 作为溶剂的三元体系中 PLA 排斥凝聚的不同阶段。(a) PDMS 分散于 PLA/DCM 中; (b) 相反转形成不稳定的 PLA/DCM 液滴于 PDMS 中; (c) 凝聚液滴稳定分散; (d) PDMS 加入过量后聚合物颗粒的聚集和沉淀

聚合物 2-聚合物 3 排斥凝聚相对于聚合物去溶剂化凝聚的主要优势是凝聚体和分散相的组成和黏度可以得到很好的控制。因而,可以控制粒径和防止不必要的凝聚体液滴的聚集;同时,也能增加润湿和包裹任何固体或液体形式的生物活性物质。事实上,囊芯的包裹要求囊芯与凝聚物之间的黏附力要比囊芯与分散相之间的作用力要强得多^[44],而这种作用力取决两相的组成。同时,凝聚体液滴一定程度的流动性也会提高包裹过程的质量和数量。

研究表明采用这种凝聚方法进行药物微囊包裹化很适于提高 PLA 和 PLGA 包裹肽类和蛋白质药物的包封率。然而,微粒中残留的凝聚剂和硬化剂难以充分除去是这种方法的缺点,这可能会妨碍其生物医学应用。因此,采用

相对安全的凝聚剂及硬化剂,并尽可能地减少成品中残留工艺液体,是人们正在努力的方向^[45]。

4. 应用

聚合物 2-聚合物 3 排斥制备凝聚体的方法广泛应用于生物可降解材料 PLA 和 PLGA 的微囊化包裹^[42](参见本书“微球技术及其应用”一章)。这种类型的微球可用于注射给药及强效低剂量药物的控释。这种方法制备的微球粒径范围为 20~150 μm ,取决于工艺参数,可以用常规注射器进行注射。据我们所知,市场上至少有一种以 PLGA 为骨架的微球产品用于注射,而该产品就是用这个特殊的方法制备的[德国 Ferring AG 公司的 Decapeptyl® Retard,含有促黄体(生成)激素-释放激素类似物十肽曲普瑞林]。

聚合物在多元体系中非共价交联的凝聚

1. 原理与机制

溶液体系中复合凝聚体可以看成一种特殊的网状结构。聚合物之间的、聚合物与低摩尔质量物质之间的分子间力如库仑力、范德华力、疏水作用力、氢键、偶极电荷转移等可以引起相分离,使得聚合物浓缩为胶体相或沉淀物。分离相的质量很大程度上取决于参与分子的化学性质及分离条件。以下基于各种主要相互作用和组合已有报道:①相反电荷的聚合电解质(“聚盐”);②强极化聚合物;③H-供体/受体聚合物;④聚合电解质/多价反离子。

图 4 为体系 1 和 2 的复合凝聚。体系 1 中,复合物由两种不同聚合物的分子间力交联而成[图 4 (a)],而体系 2 中,复合物由一种聚合物分子内或分子间力桥联而成[图 4 (b)]。两种类型复合物的具体例子有海藻酸钠(聚阴离子)和壳聚糖(聚阳离子),以及海藻酸钠(聚阴离子)/钙离子(二价反离子)。

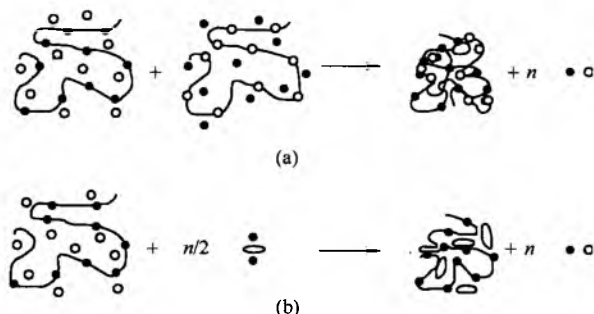


图 4 复合水性凝聚的原理。(a) 相反电荷的聚电解质; (b) 聚电解质/多价反离子

从动力学角度看,阳离子和阴离子之间的复合物形成一般都很迅速,速率通常几分之一秒,尽管整个过程需要几小时或者几天时间^[46]。复合物形成的限速步骤为

- 分子间接触的扩散过程;
- 复合凝聚体的重排,包括构象变化和解开缠结。

具体来说,这些排列与低电荷密度的聚电解质组分和(或)聚电解质组分在相对分子质量上的显著不同以及浓缩体系有关^[47]。

聚电解质反应的化学计量比一般为1:1^[48],尽管聚离子反应的最适比例可能高达20:1。一般来说,当聚合物浓度降低时,参与反应的聚合物链数增加。进一步说,如果聚合物-溶剂相互作用的参数(Flory-Huggins)很高,那么聚合物的电荷密度要求较低。强电解质反应的化学计量比一般为1:1,如通过在合成季铵盐时典型的长侧链基团,空间位阻可以干扰所谓的疏合物的比率^[49]。

2. 有效的聚合物-聚合物凝聚的大分子特性

通过离子相互作用和形成氢键的聚合物-聚合物复合物,存在一个临界链长,低于这个链长不存在竞争性结合^[50]。一般来说,形成聚盐是各种化合物参数包括相对分子质量/链长、电荷密度、化学结构、离子基团类型及链结构综合作用的结果。有趣的是,只要其中一个聚合物是两性的(如明胶在另一个聚合物的电场中发生极化作用^[51]),那么两种静电荷相同的聚电解质就可以形成复合物。除此之外,介质的性质(如pH、离子强度、总浓度、温度)也会影响复合物形成的动力学和复合物性质。

到目前为止,藻酸盐-聚(L-赖氨酸)和藻酸盐-壳聚糖是最常用的聚合物-聚合物凝聚体系,前者通常预胶化,为小珠的形式,带有二价阳离子如钙离子或钡离子。表2表明,具有刚性结构的多糖通常有利于形成聚盐。

表2 应用于复合物凝聚的典型聚合物

聚阴离子	聚阳离子
藻酸盐	壳聚糖
角叉菜胶	聚氯化2-丙烯基双甲基胺
羧甲基纤维素钠	聚L-赖氨酸
硫酸软骨素	聚乙烯胺
纤维素	
胶凝糖	
透明质酸酶	
聚丙烯酸	
黄色素	

聚阴离子-聚阳离子结合通常发生在一种电荷稳定的聚合物和一种电荷为pH敏感的聚合物之间。另外,还需要次级相互作用,主要是氢键结合,同样其中一条链的也要求柔软^[52]。

对于藻酸盐,共聚合物组成(甘露糖醛酸与古洛糖醛酸比例)会影响最后聚合物的性质,包括弹性、渗透性、凝聚体二维结构的机械阻力及球体的膜结构。聚合物-聚合物凝聚体的类型(沉淀、溶液和网状系统)通常与相对分子质量高度相关,在一个很窄的窗口可以找到有用的膜。这通常与生物应用所需要的相对分子质量范围(通常以一些因素如细胞毒性和生物相容性评价)没有很大关系。

3. 特性

聚合物-聚合物凝聚体是最重要的制成半透膜。它们是离子交联的聚合物网状结构,可以透过水和小相对分子质量溶质,阻止一定相对分子质量以上的大分子和蛋白质透过。相对分子质量阻断(MMCO)实验可以通过反相体积排阻色谱进行。这些重要的实验^[53]可以监测人工探针的流入和生物大分子的流出。在穿过曲折孔道时涉及的立体结构和静电相互作用表明表观MMCO取决于大分子溶质的化学性质。特别是高的交联密度会导致MMCO偏低,尽管这只有在网状结构惰性时才会发生,而通常状况下并非如此^[54]。进一步说,要通过转运研究(动力学研究)与平衡扩散测定(热力学研究)来研究多数聚电解质凝胶的性质。

微囊形式的聚合物-聚合物凝聚体可以通过一系列的方法来进行表征,尽管最精确的测定是基于压缩的与敏感转换器相连的微囊探针^[55]。这些技术的精确性可高达10%。一般来说,化学计量比为1:1时得到的微囊最为稳定。其他性质,如球形度、透明度、或膜均匀性也可以测定。对二维膜的表征,基于超速离心分析的新方法特别有用。

4. 应用

表3列出一些用于形成微囊的典型的聚合物-聚合物凝聚体系。

表3 典型聚合物-聚合物凝聚

聚阴离子	聚阳离子	参考文献
海藻酸钠	聚L-赖氨酸	[76]
	壳聚糖	[77]
硫酸纤维素钠	聚氯化2-丙烯基双甲基胺(PDADMAC)	[60]
κ -角叉菜胶	二乙氨(基)乙基葡聚糖	[78]
多聚磷酸钠	壳聚糖	[79]
硫酸软骨素钠	胶原	[80]
	明胶	[81]
硫酸葡聚糖	紫罗烯	[82]
聚丙烯酸	聚乙烯亚胺	[83]
明胶	阿拉伯胶	[84]
	阿拉伯树胶	[85]
	壳聚糖	[86]

硫酸纤维素钠/PDADMAC 体系可以通过简单的一步操作包裹敏感的生物材料。到目前为止,这一体系成功解决了包裹过程中的一系列问题,包括包裹生物催化剂^[57,58]、体外解毒的肝微粒体^[59]、牛胚胎^[47]以及各种靶向和控释的药物^[60]。

聚盐可以作为微囊包裹酶(生物催化剂)、分离蛋白质^[60]与表面活性剂结合。蛋白质分离具有选择性,可以根据生物大分子的等电点来实现分离。凝聚法特别适用于那些不要改变吸收动力学特征的水溶性药物。

5. 细胞包裹的凝聚法

5.1 过程

聚合物-聚合物凝聚的细胞包裹一般可以通过挤出聚阴离子溶液来实现,加入目标细胞作为种子,在含阳离子的简单多价电解质和(或)聚电解质中收集。另一种方法是先在植物油中乳化聚合物-细胞混悬液,接着是聚阴离子的内部凝胶^[62],后者形成的凝胶更均匀。细胞微囊化很复杂^[63],包括以下步骤:

- 聚合物消毒(热消毒、紫外线或 γ 辐照消毒、化学消毒如环氧乙烷);
- 聚合物除热原,以破坏或除去潜在的毒性多糖;
- 常在培养基中将聚合物溶至指定的黏度;
- 无菌条件下稀释聚合物溶液;
- 凝聚反应控制(聚离子浓度、接触时间);
- 洗涤,以除去剩余的未反应聚合物;
- 包衣以减少通透性和(或)修饰表面性质。

5.2 细胞包裹的例子

图5显示微囊化包裹的小鼠胰岛细胞用于肝移植以实现临床上的正常血糖量。血糖会刺激胰岛细胞产生胰岛素从而可以取代每日的胰岛素注射。根据氧渗透量优化微囊大小^[64],即在水凝胶中氧扩散距离为0.2mm。化学特异性可以同时控制通透性和机械性质。长期研究结果表明,聚合物多元体系比二元体系具有明显优势^[65],多元体系的膜较厚,作为捕获区允许扩散以及机械特性的去耦合。



图5 将小鼠胰岛细胞包裹于海藻酸钠/纤维素硫酸钠/盐酸聚亚甲基二胍/ CaCl_2

现在进行的研究有生物人造肝细胞的包裹、其他激素水平低或者神经变性疾病细胞的细胞治疗,如阿尔茨海默病和帕金森病。其他的例子还有聚合物-聚合物凝聚体的细胞包裹,包括非自体的基因治疗^[66]、血液代用品^[67]以及前列腺癌^[68]的治疗。药剂学方面的应用有微囊包裹,除此之外还有有关关节炎的抗炎治疗中经皮药物和蛋白质给药。

6. 规模放大

鉴于本章的目的不在于列出一个与聚电解质复合物有关的技术清单,所以一些独特的例子并没有讨论。Shioya等^[69]的专利微囊化包裹方法可以控制通透性,而Dautzenberg等公开了制备聚电解质复合物^[70]用的一般方法和材料。最近,Prusse等发明了用机械剪切方法来分离液流,从而实现产量高达 10^4 kg/h ^[71]。其他的大体积应用技术包括转盘雾化器等。

7. 在分析中的应用

聚合物-聚合物复合物一般可以通过电导测定法和电势滴定法来测定。“胶体滴定”为已知聚合物性质的反相体系如聚乙烯醇硫酸钾或聚二烯丙基二甲基氯化铵来对聚阳离子和聚阴离子浓度定量,因此化学计量比为 $1:1$ ^[47]。采用阳离子染料甲苯胺蓝作指示剂,可以看到颜色突变的终点。两种方法都可以测定体积。

凝聚法以及相关产品工业上的应用

多年来,各种各样的微囊技术在工业生产中得到成功应用,并有大量的专利申请用来保护市场份额和产品,尤其是诊断影像的造影剂、农业和食品工业领域。与很多已上市的基于微囊技术的消费产品相比,只有非常少的药物制剂成功上市。

这些主要是一些安全方面的原因,药品的生产和上市由法规严格控制着,使得产品的开发和上市特别有挑战性。很明显,像凝聚法之类的技术要在工业化大规模应用需要一个可靠和稳定的生产工艺和产品设计,这是整个开发工作的出发点,不过其他一些重要的标准也有推动作用,如图6所示。这些基本因素是如何应用于凝聚法制备的产品呢?为了回答这个问题,我们把制备用于注射给药的缓释微球的有机相分离过程作为一个例子来说明。

注射用控释微球质量控制的关键参数包括药物包封率、随时间变化的稳定性、可注射性、释放动力学的重现性、无菌、治疗效果、一般安全性以及局部耐受性。其中一些方面适用于所有的微胶囊化技术制得的产品,而其他方面主要与凝聚法制备有关。而且,对于注射或雾化,微球需要一个合适的分散剂以润湿颗粒并保持混悬以利于给药。复溶的载体需要更多的开发努力,因为微球的表面性质可能是疏水的,尤其当颗粒是由凝聚法制备,并在亲脂性的硬化剂中物理硬化。根据作者的经验,有时会疏忽分散剂处方的开发,特别是活性物质和稀释剂不在同一场所生产

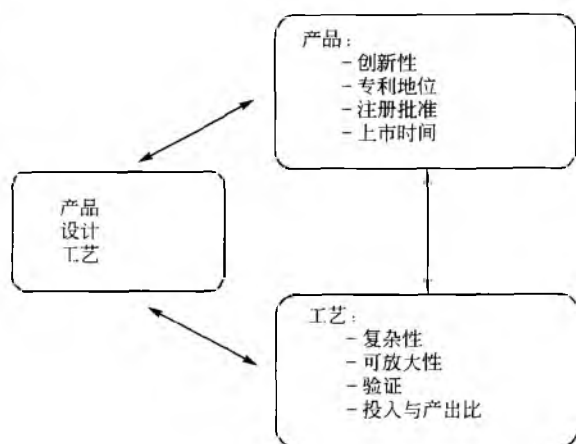


图6 凝聚法在制药工业中成功应用的重要因素

的时候。

凝聚法是一个典型的分批工艺，它只需要标准的设备而不需要昂贵的投资，这与连续型的微囊工艺形成不同，如无菌喷雾干燥。对于可放大性、与批规模无关的、合适的可重复的剪切和搅拌条件，是很重要的。选择适合按比例放大实验室和中试设备，并有合适的仪器监控设备的关键参数（如搅拌和温度）是开发工作的基础。此外，将给定药物或生物活性物质加入或分散于凝聚体系也要特别注意。药物粉末和药物溶液的颗粒大小、分散性是获得高的、一致的包封率和重现的释放动力学的关键参数。在有机相分离中，清洁验证是一项非常具有挑战性的任务，因为凝聚体和硬化剂的清洁程序需要有效去除所有凝聚组分，包括非包裹的药物或生物活性物质的溶剂和去污剂。由于此项的困难，用于这一关键工艺的设备必须是专门的，以避免交叉污染。在该方面，水体系的微囊化比有机体系要容易处理。

尽管如此，对于包裹高活性的水溶性药物（如多肽和蛋白质）有机相分离仍然是一个有吸引力的方法。由于生产中使用大量的有机溶剂，意味着要设计防爆设备和厂房。而且，出于安全方面的考虑，残留的溶剂和硬化剂可能影响显著的成果。进行的努力有采用更具生物相容性的硬化剂如十四酸异丙酯或丙烯甘油辛酸酯/癸酸酯来代替传统的烃类和硅氧烷，用于含曲普瑞林的商品化的 PLGA 微球 (Decapeptyl® Retard) 的硬化。显然，这种改进与专利保护有关^[72,73]。重要的是，工艺溶剂的改变不需要新药申请，但由注册机构作为已经批准的工艺的批准后变更审批。如今进入市场的时间是成功的关键因数，选择性质已知的和广泛接受的材料的是至关重要的。在这一点上，凝聚法是一个要求很多的技术，因为可用的和安全的聚合物、溶剂和硬化剂是有限的。因此，在决定将这项技术用于医药工业之前，材料的质量、可获得性和花费都必须好好地估算。当然这种决定也必须考虑治疗的需求。注册审批机构在仔细权衡处方可能的缺点和可预见的治疗效果之间赞成与反对的比例，采用快速审批通道，像癌症治疗这类的挽救生

命的活动将从中受益。毫不惊奇的是，注射用微囊长效制剂主要用于特殊的适应证，需要在相对少量的患者中采用有限的并且控制很好的给药次数。

尽管凝聚法在制药工业中成功使用，该法及其他微囊技术的复杂性我们都不能低估，尤其是无菌条件下大规模的工业生产。在开展阶段必须考虑工艺设计，以保证工业生产步骤最简化。在这一方面，通过有机相分离制备无菌产品需要很多单元操作：

- 无菌过滤/辅料的灭菌；
- 混合/分散和搅拌；
- 物理或化学的方法硬化；
- 过滤；
- 洗涤和筛分；
- 分装和初包装（小瓶和注射器）；
- 冷冻干燥；
- 最终灭菌或全过程的无菌操作。

出于稳定性和安全性考虑，在洁净室环境中进行全无菌用仍然是首选的方法，尽管无菌凝聚工艺中操作人员的密集干预带来潜在污染的风险。相反，通过 γ 射线和电子射线辐照的最终灭菌为其提供了很高程度的无菌保证，但是辐照灭菌的验证和文件的工作量是很大的^[74,75]，尽管辐照灭菌在医疗设备工业中是标准方法，还没有被所有国家接受，这将阻碍产品在多个国家的申请和延迟产品的上市时间。

总之，凝聚法的可行性已经在工业规模中展现出来，平心而论，这种技术在制药工业中只是很偶尔地使用。主要是由于它在物理化学方面的复杂性和与残留物或工艺组分有关的限制，已经有不少通过更简单的技术来代替凝聚法的努力。至于凝聚技术在制药工业中新的应用能否成功地商业化，在很大程度上取决于市场需要和这些新产品给患者带来的好处，而法规的要求会起到很大的作用。在这一方面，相对于那些经典的治疗手段，组织工程领域有前景的技术将会面对更大的挑战。

结论

自从 20 世纪 30 年代凝聚法发现到现在，关于凝聚法、潜在机制、热力学、材料学和应用都进行了大量的研究。尽管如此，但在以凝聚法为基础的药学领域中研究成果和创新相对较少。很明显，这一领域的科学成就目前为止超过了商业应用和利益，如糖尿病和人工器官。当前，凝聚法在 DNA 聚合物系统的 DNA 传递、生物技术、食品和农业方面都有很大的吸引力。在食品方面，调料或特殊风味的调料、香料、酸、碱、人工甜味剂、色素、防腐剂、膨化剂已经通过凝聚法被其他材料包裹（如淀粉、糊精、蛋白质和脂类）；在农业领域，以凝聚法为基础的微胶囊技术也被广泛使用，如包裹种子。总之，凝聚法会将细胞内外复合物如肝素-蛋白、脱氧核糖核酸-蛋白、肾上腺素激动剂-蛋白的生物学和功能相关联。这些复合物的结合和解离

对 pH、无机离子以及膜电位十分敏感。尽管还没有阐明可产生药理学作用的过程,但这些特征还是较合理的。

参考文献

1. Everett, D. H. IUPAC—Division of Physical Chemistry, Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units—Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry. *Pure Appl. Chem.* 1992, 31 (4), 577—638.
2. Bungenberg de Jong, H. G.; Kruyt, H. R. Koazervation (Entmischung in Kolloidalen Systemen). *Koll. Zeitsch.* 1930, 50 (1), 39—48.
3. Bakan, J. A. Microencapsulation. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy; Lachman, L., Lieberman, H. A., Kanig, J. L., Eds.; Lea & Febiger: Philadelphia, 1986; 413—429.
4. Newton, D. W. Coacervation; Principles and Applications. *Polymers for Controlled Drug Delivery*; Tarcha, P. J., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 1991; 67—81.
5. Fong, J. W. Microencapsulation by Solvent Evaporation and Organic Phase Separation Processes. *Controlled Release Systems; Fabrication Technology*; Hsieh, D., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 1988; 1, 81—108.
6. Arshady, R. Microspheres and Microcapsules, a Survey of Manufacturing Techniques, Part II: Coacervation. *Polym. Eng. Sci.* 1990, 30 (15), 905—914.
7. Stott, P. W.; Williams, A. C.; Barry, B. W. Characterization of Complex Coacervates of Some Tricyclic Antidepressants and Evaluation of their Potential for Enhancing Transdermal Flux. *J. Controlled Release* 1996, 41 (3), 215—227.
8. Leong, K. W.; Mao, H.-Q.; Truong-Le, V. L.; Roy, K.; Walsh, S. M.; August, J. T. DNA-Polycation Nanospheres as Non-Viral Gene Delivery Vehicles. *J. Controlled Release* 1998, 53 (1—3), 183—193.
9. Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. 'Smart' Polymers and What they Could Do in Biotechnology and Medicine. *Trends Biotechnol.* 1999, 17 (8), 335—340.
10. Flory, P. Principles of Polymer Chemistry; Cornell University Press: Ithaca, New York, 1953; 495—594.
11. Dobry, A.; Boyer-Kawenoki, F. Phase Separation in Polymer Solution. *J. Polym. Sci.* 1947, 2 (1), 90—100.
12. Robinson, D. H. Ethyl Cellulose-Solvent Phase Relationships Relevant to Coacervation Microencapsulation Processes. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1989, 15 (14—16), 2597—2620.
13. Hildebrand, J. H.; Scott, R. L. The Solubility of Nonelectrolytes; Reinhold: New York, 1950; 424—434.
14. Hansen, C. M. The Three-Dimensional Solubility Parameter—Key to Paint Component Affinities; II And III. *J. Paint Technol.* 1967, 39 (511), 505—514.
15. Van Krevelen, D. W. Properties of Polymers; Elsevier: Amsterdam, 1990; 200—220—290—297.
16. Barton, A. F. M. Handbook of Solubility Parameters and Other Cohesion Parameters; CRC Press: Boca Raton, FL, 1991; 95—111.
17. Scott, R. L. The Thermodynamics of High Polymer Solutions. V. Phase Equilibria in the Ternary Systems; Polymer1 - Polymer2 - Solvent. *J. Chem. Phys.* 1949, 17 (3), 279—284.
18. Van-Oss, C. J. Acid-Base Effects At Polymer Interfaces. *Polymer Surfaces and Interfaces II*; Feast, W. J., Munro, H. S., Richards, R. W., Eds.; John Wiley: New York, 1993; 267—290.
19. Magdassi, S.; Vinetsky, Y. Microencapsulation of Oil-in-Water Emulsions by Proteins. *Microencapsulation; Methods and Industrial Applications*; Benita, S., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1996; 21—33.
20. Conti, B.; Giunchedi, P.; Conte, U. Cellulose Microarticles in Drug Delivery. *STP. Pharma Sci.* 1997, 7 (5), 331—342.
21. Chen, H.; Wu, J. C.; Chen, H. Y. Preparation of Ethyl Cellulose Microcapsules Containing Theophylline by Using Emulsion Non-Solvent Addition Method. *J. Microencapsulation* 1995, 12 (2), 137—147.
22. Kaeser-Liard, B.; Kissel, T.; Sucker, H. Manufacture of Controlled-Release Formulations by a New Microencapsulation Process, the Emulsion-Induction Technique. *Acta Pharm. Technol.* 1984, 30 (4), 294—301.
23. Pongpaibul, Y.; Whitworth, C. W. Microencapsulation by Emulsion Non-Solvent Addition Method. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1986, 12 (14), 2387—2402.
24. Madan, P. L.; Madan, D. K.; Price, J. C. Clofibrate Microcapsules; Preparation and Release Rate Studies. *J. Pharm. Sci.* 1976, 65 (10), 1476—1479.
25. Rozenblat, J.; Magdassi, S.; Garti, N. Effect of Electrolytes, Stirring and Surfactants in the Coacervation and Microencapsulation Processes in Presence of Gelatin. *J. Microencapsulation* 1989, 6 (4), 515—526.
26. Tirkkonen, S.; Urtti, A.; Paronen, P. Buffer Controlled Release of Indomethacin from Ethylcellulose Microcapsules. *Int. J. Pharm.* 1995, 124 (2), 219—229.
27. Lavasanifar, A.; Ghalandari, R.; Arael, Z.; Zolfaghari, M. E.; Mortazavi, S. A. Microencapsulation of Theophylline Using Ethylcellulose; In Vitro Drug Release Kinetic Modelling. *J. Microencapsulation* 1997, 14 (1), 91—100.

28. Bachtisi, A. R.; Kiparissides, C. Synthesis and Release Studies of Oil-Containing Poly (vinyl Alcohol) Microcapsules Prepared by Coacervation. *J. Controlled Release* 1996, 38 (1), 49—58.
29. Genç, L.; Demirel, M.; Güler, E.; Hegazy, N. Microencapsulation of Ketorolac Tromethamine by Means of a Coacervation-Phase Separation Technique Induced by Addition of Non-Solvent. *J. Microencapsulation* 1998, 15 (1), 45—53.
30. Miguez, M. J. B.; Rodrigues, B. C.; Sanchez, M. N. M.; Laranjeira, M. C. M. Preparation and Scanning Electronic Microscopy Study of Chitosan/Polyvinyl (alcohol)-Encapsulated Crude Urease Extract. *J. Microencapsulation* 1997, 14 (5), 639—646.
31. Stolberg, J.; Laranjeira, M. C. M.; Sanchez, M. N. M.; Klug, M.; Fávère, V. T. Microspheres of Chitosan/Polyvinyl (alcohol) Incorporating Tetrasulphonated Copper (II) Phthalocyanine; Preparation and Characterization. *J. Microencapsulation* 1999, 16 (4), 431—438.
32. Santhi, K.; Dhanaraj, S. A.; Rajendran, S. D.; Raja, K.; Ponnunsankar, S.; Suresh, B. Nonliposomal Approach—A Study of Preparation of Egg Albumin Nanospheres Containing Amphotericin-B. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1999, 25 (4), 547—551.
33. Santinho, A. J. P.; Pereira, N. L.; de Freitas, O.; Collett, J. H. Influence of Formulation on the Physicochemical Properties of Casein Microparticles. *Int. J. Pharm.* 1999, 186 (2), 191—198.
34. Ezpeleta, I.; Irache, J. M.; Gueguen, J.; Orecchioni, A. M. Properties of Glutaraldehyde Cross-Linked Vicilin Nanoand Microparticles. *J. Microencapsulation* 1997, 14 (5), 557—565.
35. Irache, J. M.; Bergougnoux, L.; Ezpeleta, I.; Gueguen, J.; Orecchioni, A. M. Optimization and In Vitro Stability of Legumin Nanoparticles Obtained by a Coacervation Method. *Int. J. Pharm.* 1995, 126 (1), 103—109.
36. Thies, C. Microcapsules As Drug Delivery Devices. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 1982, 8 (4), 335—383.
37. Madan, P. L. Microencapsulation I. Phase Separation or Coacervation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1978, 4 (1), 95—116.
38. Microscopic Capsules Containing Oil, US Patent 2 800 458, July 23, 1957
39. Weiss, G.; Knoch, A.; Laicher, A.; Stanislaus, F.; Daniels, R. Simple Coacervation of Hydroxypropyl Methylcellulose Phthalate (HPMCP) II. Microencapsulation of Ibuprofen. *Int. J. Pharm.* 1995, 124 (1), 97—105.
40. Kawashima, Y.; Lin, S. Y.; Kasai, A.; Takenaka, H.; Matsunami, K.; Nochida, Y.; Hirose, H. Drug Release Properties of the Microcapsules of Adriamycin Hydrochloride with Ethyl Cellulose Prepared by a Phase Separation Technique. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1984, 10 (3), 467—479.
41. Özyazici, M.; Sevgi, F.; Ertan, G. Micrometric Studies on Nicardipine Hydrochloride Microcapsules. *Int. J. Pharm.* 1996, 138 (1), 25—35.
42. Thomasin, C.; Hô, Nam-Trân; Merkle, H. P.; Gander, B. Drug Microencapsulation by PLA/PLGA Coacervation in the Light of Thermodynamics. 1. Overview and Theoretical Considerations. *J. Pharm. Sci.* 1998, 87 (3), 259—268.
43. Thomasin, C.; Merkle, H. P.; Gander, B. Drug Microencapsulation by PLA/PLGA Coacervation in the Light of Thermodynamics. 2. Parameters Determining Microsphere Formation. *J. Pharm. Sci.* 1998, 87 (3), 269—275.
44. Thomasin, C.; Merkle, H. P.; Gander, B. Physico-Chemical Parameters Governing Protein Microencapsulation into Biodegradable Polyesters by Coacervation. *Int. J. Pharm.* 1997, 147, 173—186.
45. Thomasin, C.; Johansen, P.; Alder, R.; Bemsel, R.; Hottinger, G.; Altorfer, H.; Wright, T.; Wehrli, E.; Merkle, H. P.; Gander, B. Answers to the Problem of Residual Solvents in Biodegradable Microspheres Prepared by Coacervation. *Europ. J. Pharm. Biopharm.* 1996, 42 (1), 16—24.
46. Sato, H.; Nakajima, A. Complex Coacervation in Sulfated Polyvinyl Alcohol-Amino Acetylated Polyvinyl Alcohol System. I. Conditions for Complex Coacervation. *Colloid & Polym. Sci.* 1974, 252 (4), 294—297.
47. Dautzenberg, H.; Jaeger, W.; Kötz, J.; Philipp, B.; Seidel, C.; Stscherbina, D. Polyelectrolytes; Formation, Characterization and Application; Hanser: Munich, 1994.
48. Webster, L.; Huglin, M. B.; Robb, I. D. Complex Formation Between Polyelectrolytes in Dilute Aqueous-Solutions. *Polymer* 1997, 38 (6), 1373—1380.
49. Kötz, J.; Koepke, H.; Schmidt-Naake, G.; Zarras, P.; Vogl, O. Polyanion-Polycation Complex Formation as a Function of the Functional-Groups. *Polymer* 1996, 37 (13), 2775—2781.
50. Bekturov, E. A.; Bimendina, L. A. Complexes of Water-Soluble Polymers. *J. Macromol. Sci.* 1997, C37 (3), 501—518.
51. Tan, J. S.; Harrison, C. A.; Li, J. T.; Caldwell, K. D. Characterization of Soluble Polyelectrolyte-Gelatin Complexes by Differential Size-Exclusion Chromatography and Flow-Field Flow Fractionation. *J. Polym. Sci.*

- Part B, *Polym. Phys.* 1998, 36 (3), 537–524.
52. Prokop, A.; Hunkeler, D.; DiMari, S.; Haralson, M. A.; Wang, T. G. Water Soluble Polymers for Immunisation I: Complex Coacervation and Cytotoxicity. *Adv. Polym. Sci.* 1998, 136, 1–51.
 53. Bartkowiak, A.; Hunkeler, D. Alginate-Oligochitosan Microcapsules: A Mechanistic Study Relating Membrane and Capsule Properties to Reaction Conditions. *Chem. Mater.* 1999, 11 (9), 2486–2492.
 54. Gehrke, S. H.; Fisher, J. P.; Palasis, M.; Lund, M. E. Factors Determining Hydrogel Permeability. *Annal. New York Acad. Sci.* 1997, 831, 179–207.
 55. Zhang, Z.; Saunders, R.; Thomas, C. R. Mechanical Strength of Single Microcapsules Determined by a Novel Micromanipulation Technique. *J. Microencapsulation* 1999, 16 (1), 117–124.
 56. Wandrey, C.; Bartkowiak, A. Membrane Formation At Interfaces Examined by Analytical Ultracentrifugation Techniques. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 2001, 180, 141–153.
 57. Stefuca, V.; Gemeiner, P.; Kurilova, L.; Dautzenberg, H.; Polakovic, M.; Bales, V. Polyelectrolyte Complex Capsules as a Material for Enzyme Immobilization. Catalytic Properties of Encapsulated Lactate Dehydrogenase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1991, 30 (3), 313–324.
 58. Mansfeld, J.; Förster, M.; Schellenberger, A.; Dautzenberg, H. Immobilization of Invertase by Encapsulation in Polyelectrolyte Complexes. *Enzyme Microb. Technol.* 1991, 13 (3), 240–244.
 59. Stange, J.; Dummier, W.; Brüggmann, E.; Falkenhagen, D.; Siegmund, E.; Ernst, B.; Dautzenberg, H. An Improved Hepatic Microsome Microencapsulation Method for Application in Extracorporeal Detoxication. *Z. Med. Laboratoriumsdiagn.* 1990, 31 (7), 366–370.
 60. Dautzenberg, H.; Loth, F.; Fechner, K.; Mehliß, B.; Pommerening, K. Preparation and Performance of Symplex Capsules. *Makromol. Chem.* 1985, (Suppl. 9), 203–210.
 61. Mattison, K. W.; Brittain, I. J.; Dubin, P. L. Protein-Polyelectrolyte Phase Boundaries. *Biotechnol. Progr.* 1995, 11 (6), 632–637.
 62. Poncelet, D.; Lencki, R.; Beaulieu, C.; Halle, J. P.; Neufeld, R. J.; Fournier, A. Production of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation. 1. Methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992, 38 (1), 39–45.
 63. Hunkeler, D. Polymers for Bioartificial Organs. *Trends Polym. Sci.* 1997, 5 (1), 286–293.
 64. Hunkeler, D.; Rehor, A.; Canaple, L.; Bernard, P.; Renken, A.; Rindisbacher, L.; Angelova, N. Objectively assessing bioartificial organs. *Bioartificial Organs: Tissue Sourcing Immunisation and Clinical Trials*; Hunkeler, D.; Cherrington, A.; Prokop, A.; Rajotte, R., Eds.; New York Academy of Sciences, November, 2001.
 65. Prokop, A.; Hunkeler, D.; Powers, A. C.; Whitesell, R. R.; Wang, T. G. Water Soluble Polymers for Immunisation II: Evaluation of Multicomponent Microencapsulation Systems. *Adv. Polym. Sci.* 1998, 136, 53–73.
 66. Awrey, D. E.; Tse, M.; Hortelano, G.; Chang, P. L. Permeability of Alginate Microcapsules to Secretory Recombinant Gene-Products. *Biotech. Bioeng.* 1996, 52 (4), 472–484.
 67. Chang, T. M. S. Future Prospects for Artificial Blood. *Trends Biotechnol.* 1999, 17 (2), 61–67.
 68. Machluf, M.; Orsola, A.; Atala, A. Controlled Release of Therapeutic Agents: Slow Delivery and Cell Encapsulation. *World J. Urol.* 2000, 18 (1), 80–83.
 69. Shioya, T.; Hirano, R. Process for Producing Capsules Having a Permeability-Controllable Membrane, US Patent 5, 089, 272, February 18, 1992.
 70. Dautzenberg, H.; Loth, F.; Pommerening, K.; Linow, K. J.; Bartsch, D. Microcapsules and Process for the Production Thereof., UK Patent Application GB 2 135 954, September 12, 1984.
 71. Prusse, U.; Fox, B.; Kirchhoff, M.; Bruske, F.; Breford, J.; Vorlop, K.-D. New Process (Jet Cutting Method) for the Production of Spherical Beads from Highly Viscous Polymer Solutions. *Chem. Eng. Technol.* 1998, 21 (1), 2933.
 72. Komen, J.; Groenendaal, J. W. Process for Microencapsulation, US Patent 5, 066, 436, November 19, 1991.
 73. Nerlich, B.; Gustafsson, J.; Mank, R.; Hørig, J.; Köchling, W. Process for the Microencapsulation of Water-Soluble Medicaments, DE Patent 42 23 169 C1, November 25, 1993.
 74. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Decision Trees for the Selection of Sterilisation Methods, London, 1998.
 75. European Guide to Good Manufacturing Practice, 1997, Annex 12, The Use of Ionising Radiation in the Manufacture of Medicinal Products, Brussels, 1997.
 76. Lim, F.; Sun, A. M. Microencapsulated Islets As Bioartificial Endocrine Pancreas. *Science* 1980, 210 (4472), 908–910.
 77. Thu, B.; Bruheim, P.; Espevic, T.; Smidsrød, O.; Soon-Shiong, P.; Skjak-Braek, G. Alginate Polycation Microcapsules. 1. Interaction Between Alginate and Polycation. *Biomaterials* 1996, 17 (10), 1031–1040.

78. Loefroth, J. E.; Johansson, L.; Norman, A. C.; Wettström, K. Interaction Between Surfactants and Polymers. *Progr. Colloid Polym. Sci.* 1991, 84, 78—82.
79. Kawashima, Y.; Handa, T.; Kasai, A.; Takenaka, H.; Lin, S.; Ando, Y. Novel Method for the Preparation of Controlled-Release. Theophylline Granules Coated With a Polyelectrolyte Complex of Sodium Polyphosphate-Chitosan. *J. Pharm. Sci.* 1985, 74 (3), 264—268.
80. Shao, W.; Leon, K. W. Microcapsules Obtained from Complex from Complex Coacervation of Collagen and Chondroitin Sulfate. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 1995, 7 (5), 389—399.
81. Brown, K. E.; Leong, K.; Huang, C. H.; Dolal, K.; Green, G. D.; Hianes, H. D.; Jimenex, P. A.; Bathon, J. Gelatin/chondroitin 6-sulfate Microspheres for the Delivery of Therapeutic Proteins to the Joint. *Arthritis Rheum.* 1998, 41 (12), 2185—2195.
82. Davison, C. J.; Smith, K. E.; Hutchinson, L. E. F.; O'Mullane, J. Physical and Biological Properties of Water Soluble Polyelectrolyte Complexes. *J. Bioact. Compat. Polym.* 1990, 5 (3), 267—282.
83. Kono, K.; Tabata, F.; Takagishi, T. pH Responsive Permeability of Poly (acrylic Acid)-Poly (ethyleneimine) Complex Capsule Membrane. *J. Membrane Sci.* 1993, 76 (2—3), 233—243.
84. Burgess, D. J.; Carless, J. E. Microelectrophoretic Studies of Gelatin and Acacia for the Prediction of Complex Coacervation. *J. Colloid Interface Sci.* 1984, 98 (1), 1—8.
85. Lamprecht, A.; Schäfer, U. F.; Lehr, C. M. Visualization and Quantification of Polymer Distribution in Microcapsules by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). *Int. J. Pharm.* 2000, 196 (2), 223—226.
86. Remunanlopex, C.; Bodmeier, R. Effect of Formulation and Process Variables on the Formation of Chitosan-Gelatin Coacervates. *Int. J. Pharm.* 1996, 135 (1—2), 63—72.

(刘笑芬 柴旭煜 吴金金 译)



欧洲药品评价委员会

David M. Jacobs

David M. Jacobs Consulting, Basel, Switzerland

引言

欧盟的历史

第二次世界大战后，欧洲产生了“欧洲合众国”的想法，并于1957年欧洲六国（德国、比利时、法国、意大利、卢森堡和荷兰）签署了罗马条约，成立了欧洲经济共同体（简称欧共体，ECC）。1973年，爱尔兰、英国和丹麦加入欧共体。1974年，欧共体各国元首和政府首脑决定通过直接投票选举产生欧洲议会，欧洲议会可以像欧洲理事会（EC）一样定期举行会议，处理欧共体内部事务并开展政治合作。1981年希腊加入欧洲理事会，1986年西班牙和葡萄牙也相继加入。1992年，12国外交部长签署了《马斯特里赫特条约》，成立了欧洲联盟（简称欧盟，EU），在欧盟内部，劳动力、资金、商品和服务可以自由流动。最终奥地利、芬兰和瑞典也于1995年加入欧盟。1999年5月1日生效的《阿姆斯特丹条约》进行了更深刻的制度变革，比如草案文本要经过欧洲议会和欧洲理事会的双重批准才能产生法律效力。欧盟现在包含15个成员国，每个成员国都有自己的国家政府和立法机关。

欧共体拥有三项重要职能：

（1）欧共体内部15个成员国采用相同的“欧洲法律”（“指令”或“法令”）；

（2）废除成员国的某些财政计划；

（3）签署国际合作或贸易协议。

欧共体的决策都是由位于布鲁塞尔、斯特拉斯堡和卢森堡的总部制定的。自1974年起，欧盟召集15个成员国元首和政府首脑以及理事会主席，制定主要指南和政治目标，并就欧盟理事会部长未达成共识的问题进行仲裁。每个成员国担任理事会轮值主席国6个月。

欧盟机构及立法机关

欧洲委员会代表欧共体的利益，负责起草共同计划，共同计划获得欧盟理事会部长会议通过之后即付诸实施。欧洲委员会由20名委员组成，17 000名永久编制人员进行辅助性工作。这17 000名永久编制人员多数在布鲁塞尔。虽然欧洲委员会与各国政府保持相对独立，但却受欧洲议会控制。欧洲委员会执行共同政策并进行国际协议谈判。在欧洲法院还未强制要求各成员国实施该法案时，欧洲委员会还可以采取其他行动。企业总署（机构的正式名称为工业总署）内部的药品和化妆品部负责起草并实施欧洲的

药品法规。

欧洲议会有626名议会代表，议会代表都是每5年进行直接选举产生的。欧洲议会负责审查颁布各项指令和法规，欧洲议会可以通过、修改或拒绝该指令和法规。欧洲议会监督欧洲委员会的工作，它可以在运作遇到困难时对委员会进行改制，并对欧盟年度预算进行投票。

欧盟理事会的部长定期会面，根据欧洲议会提出的意见采纳欧洲指令和法规。当理事会有问题需要处理时，相关领域的部长们会聚集起来举行会议（比如，15个成员国的卫生部长会代表理事会处理药品监管或健康问题）。欧洲理事会轮值主席国同时负责主持部长组成的欧盟理事会。根据辅助性原则，欧盟立法的目的是维护共同利益，建设一个平衡而富有活力的欧洲。

部长委员会可以采取多种立法形式，其限制性或多或少。

- “法规”：直接适用于所有公民。
- “指令”：间接适用于所有公民（比如，各国根据该指令制定法律之后适用）。
- “决定”：直接适用于机构、团体、企业或特定的人。
- “建议和意见”：不具备法律约束力，对各国立法起到指导性作用。

欧盟关于药品和兽药的法律

欧盟关于药品立法的基础是1965年颁布的65/65/EEC^[1]指令。当时这项指令只对最初的六个成员国生效。这项指令给出了药品的定义，并规定了申报药品必需的数据。这项指令后来经过了不断的更新、修订与完善，但仍然是药品立法的基础。

制定第一项指令之后的十年间又出台了三项新指令，这三项指令旨在提高公共健康水平、促进区域内药品的流通。75/318/EEC^[2]指令设置了专利药品测试标准，如分析、药理毒理和临床试验标准；75/319/EEC^[3]指令建立了人用药品评价委员会（CPMP）和部分互认程序；同时75/320/EEC^[4]建立了专门监督药品法令实施过程的药品委员会。

随后的多年里，进一步鼓励各国卫生机构在欧盟层面上开展更广泛的合作。83/570/EEC^[5]和87/22/EEC^[6]两个指令建立了跨国程序和成员国间的协调程序。这些程序为成员国之间药品审批提供了信息交换机制，并简化了各国药品审批机构承认别国对该申请的决定的程序。在协调程序上，CPMP负责提高申请可行性的设想，但对成员国当

局没有太大约束。跨国程序是建立在一个成员国获得其他成员国卫生当局批准承认的基础上的。

欧洲药品评价委员会 (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA) 是依据 EEC 法规理事会 1993 年 7 月 22 日颁布的第 2309/93^[7] 法规, 于 1993 年 10 月 29 日建立起来的, 总部位于伦敦。1995 年 2 月 1 日正式开始工作。2309/93 法规还建立了单方区域范围内药品和兽药的审批程序的法律基础。

同时, 93/39/EEC^[8] 指令对 65/65/EEC^[1] 指令、75/318/EEC^[2] 指令和 75/319/EEC^[3] 指令进行了修订, 并建立了分散程序 (一般称为互认程序)。

欧洲药品评价委员会

1. 任务

EMEA 的主要任务就是通过以下途径致力于保护并提升公众健康与动物健康:

集中欧盟范围内的科研资源进行高质量的药品评价, 对研发项目提出建议, 为药品使用者和医务工作者提供有用、明确的信息。

建立有效且透明的程序, 以保证药品使用者可以通过欧洲一个市场机构就能及时了解新药信息。

控制人用药品及兽药的安全性, 尤其是通过药物警戒网络或设置一个产品动物安全残留限度来控制药品安全性。

2. 组织结构

欧洲体系是建立在成员国卫生当局和 EMEA 之间的合作基础上的。EMEA 是协调各成员国的科研资源组织网络的重要焦点。EMEA、成员国卫生当局与欧盟机构之间的合作, 对于欧洲行政程序的正常运作是至关重要的。

EMEA 受管理委员会的监督, EMEA 通过他们的合作伙伴和两个科学委员会来进行科研活动。管理委员会、科学委员会和合作方由 EMEA 秘书处管理, 秘书处由一名执行理事负责。

每个成员国派两名代表加入管理委员会, 同时, 欧洲议会和欧洲委员会也各派两名代表参加。冰岛和挪威的代表是欧洲经济区 (EEA) 代表, 而不是欧盟代表, 但他们也参加管理委员会的会议。2000 年 1 月 1 日, 冰岛和挪威正式加入了 EMEA。管理委员会指派一位执行理事, 每年对财政预算和工作计划进行审批。根据欧洲议会的建议, 管理委员会应放权给执行理事, 由执行理事负责实施预算。

EMEA 主要的科研机构是人用药品评价机构 (CPMP) 和兽药评价机构 (CVMP)。他们由各成员国 (包括挪威和冰岛) 派两名代表组成, 他们主要负责向 EMEA 提出独立的科研意见。EMEA 秘书处由四个单位组成: 行政部门、人用药品评价机构、技术协调处、兽药评价机构。

行政部门负责行政与财务, 以保证秘书处及工作人员履行他们的职责。行政部门下属人力资源部门、预算与设

施部门、会计部门。

人用药品评价机构主要有以下职责:

- 集中程序下对药品审批进行管理;
- 对被批准的药品进行上市后监管;
- 对互认程序引起的区域内待批准药品和仲裁进行管理;

- CPMP 和其他部门, 在欧洲和世界范围协调工作。

人用药品评价机构包括三个细分部门: 法规及药物警戒部、生物技术和生物制品部、新化学物质部。

兽药评价机构主要有以下职责:

- 集中程序下对药品审批进行管理;
- 管理允许用于动物来源的食物中兽药的最大残留限度的申请;
- 对被批准的药品进行上市后监管;
- 对互认程序引起的区域内待批准药品和仲裁进行管理。

- CVMP 和其他部门, 在欧洲和世界范围协调工作。

兽药评价机构有两个细分部门: CVMP 和兽药审批部门、兽药安全部门。

技术协调处为人用药品及兽药评价活动提供后勤支持, 同时也为 EMEA 提供常规的服务, 包括文件管理、会议服务、技术信息支持。技术协调处包括四个细分部门: 检查部门、文件管理及印刷部门、会议服务部门、技术信息部门。检查部门协调检查工作, 实施互认协议, 监察欧盟内部药品批准。技术协调处为质量部门提供秘书服务, 协调 EMEA 的质量管理工作。

3. EMEA 科学委员会

CPMP 和 CVMP 是 EMEA 的两个科学委员会, 他们主要负责推动成员国对药品审批的质量标准、安全标准和有效标准进行正确的科学决策。

CPMP 和 CVMP 的成员都独立于提名国, 为 EMEA 工作。有大约 2300 名欧洲专家为科学委员会工作, 他们都是由成员国的国家管理当局依据药品评价的经验提名的。专家们可以作为部门或 CPMP 或 CVMP 的专家团。

科学委员会负责委派大会报告起草人及辅助起草人, 比如, CPMP 和 CVMP 中负责审查档案的人员。委员会应保证所有成员都承担过大会报告起草工作或辅助起草工作。当 EMEA 有特殊要求时, 委员会会为成员国管理当局提供补偿, 以作为委员会成员或欧洲专家的服务的回报。

CPMP 与人用药品的评价

CPMP 成员依据集中程序作为大会报告起草人或辅助起草人, CPMP 来决定是否批准药品上市。EMEA 管理该程序, 直到药品被批准上市。EMEA 还要准备将 CPMP 的意见翻译成 11 种欧盟官方语言。根据科学建议设立质量管理标准, 并根据集中批准产品的生命周期建立跟踪系统。递交再批准、变更、扩大审批申请时, 大会报告起草人起

到关键作用。EMA 还设立不良反应及时报告、药品的周期性安全数据更新报告和其他跟踪报告。大会报告起草人和辅助起草人还要参与制定紧急安全限制程序。

新药申办者会就其研发项目向 CPMP 征求建议。CPMP 设立了一个科学建议审查团,以扩大 CPMP 的科研力量,CPMP 还采取了一套为新药研发者提供科学建议的标准操作程序。

1. 部门

除了 CPMP 和 CVMP 联合质量管理部门以外,CPMP 和 CVMP 各有四个部门。EMA 还有一个植物药部门。

CPMP 部门主要与生物技术、有效性、安全性和药物警戒工作有关。CVMP 部门主要与残留安全值、动物免疫药品、兽药警戒以及有效性工作有关。

这些部门撰写工作报告,提出需要关注的问题、指南解读、CPMP/CVMP/ICH 联合指南。该联合指南为所有成员国以及药品生产商与兽药生产商提供最新的科研资讯。

1.1 生物技术部门

生物技术部门负责生物技术和生物制品的生产及控制,并提出科学建议。例如,最近举办了研讨会,讨论了有关海绵样脑病变(TSE)鉴别分析的应用,以及通过血液制品传播新克雅氏综合征(nv-CJD)的潜在危险。

1.2 有效性部门

有效性部门负责探讨特殊疾病治疗的临床试验方法和指南。该部门与其他部门一起制定了口服缓控释制剂和透皮制剂的释放、药代动力学、新疫苗的现场检查、基因治疗和细胞培养流感疫苗的指南。

1.3 药物警戒部门

应 CPMP 和各成员国当局的要求,该部门负责药品安全性相关事宜,协调总结药品的特性与上市药品的包装宣传。该部门定期与美国 FDA 进行电视会议,商讨双方的共同利益。该部门还开展了个人安全病例报告数字传输的中试计划,为数不多的各国当局及市场人员也参与了该计划。

1.4 安全性部门

安全性部门负责临床前的安全性事宜,并与生物技术部门合作,制定并实施质量管理指南、转基因产品的非临床试验及临床试验指南。

1.5 FDA 专家委员会及其他团体

此外还成立了赋形剂专家委员会、脂肪代谢障碍专家委员会、抗反录病毒药品专家委员会等。这些跨学科团体对药品进行评价(包括对邻乙汞硫基苯酸钠进行评价),旨在减少药品接触汞与有机汞化合物。

2. 与其他管理当局的合作

2.1 欧洲药物及药物依赖监测中心(EMCDDA)

EMA 支持制定新合成药物风险评估指南。

2.2 国际协调会议(ICH 和 VICH)

EMA 作为 ICH 的六个合作伙伴之一,积极地参与 ICH 指南的撰写与修订。人用药品评价部门支持协调委员会、欧盟项目负责人和 CPMP 制定、审查、管理 ICH 指南。同样的,自 1996 年设立了 VICH 以后,兽药评价部门要辅助协调委员会、CVMP 以及各部门。

2.3 中欧与东欧

许多中欧与东欧国家(CEEC)都是欧盟成员国的候选国。候选国包括保加利亚、捷克共和国、爱沙尼亚、匈牙利、拉脱维亚、立陶宛、波兰、罗马尼亚、斯洛伐克、斯洛文尼亚和塞浦路斯。为了帮助这些国家的药品注册当局为加入欧盟做准备,专门制定了一个欧盟成员国药事管理合作协议。除此之外,还建立了各国 CEEC 审批药品的集中管理认证的简化程序。该程序是应欧盟药品注册管理部门的要求建立的,不做强制性要求。

在欧洲理事会设立的药物泛欧法规论坛的支持下,EMA 通过设立工作组和召开培训会议来管理并辅助 CEEC 和欧盟立法机构,以推广共同技术要求。议题主要包括区域立法的实施,药物警戒,上市药品的质量、安全性和有效性的评估。

同时,为了消除与 CEEC 的药品贸易技术壁垒,也在商讨关于互认 GMP 标准的协议。

CVMP 与兽药评价

CVMP 与 CPMP 有着相同的操作模式,CVMP 负责审查兽药的集中程序。CVMP 制定了许多新的指南以填补兽药研发指南的空白。

兽药评价机构不仅参加了泛欧法规论坛,而且还参加其他的关于区域立法实施、药品质量管理等活动。

1995 年 1 月 EMA 成立时,600 多种老化合物没有设定最大残留限量(MRL)。2000 年 1 月完成了对这些药品的评估。

兽药部门

与 CPMP 的部门一样,有效性部门、安全残留部门、免疫学部门和药物警戒部门共同制定兽药研究的检验和报告要求指南。

合作机构

与欧洲理事会的主要合作是针对药品和化妆品企业总



署的。但与健康和消费者保护总署也有工作往来。其他的合作还包括和研发与联合研发中心总署的合作。

1. 欧洲药品技术办公室 (ETOMEP)

欧洲委员会联合研究中心成立了一个技术办公室,专门负责管理通信网络和计算机设备,维护药品信息的流通。同时该技术办公室还负责管理 EMEA 的网站。为了药物警戒项目病例报告表能在 EMEA、各国当局和制药企业间能进行安全的传输,技术办公室建立了一套文件传输安全机制。

欧盟药品法规局的网络 (EudraNet) 是面向欧盟药品法规局与欧盟企业总署共同提供的一项面对企业的服务。EudraNet 的部分内容是向企业和普通大众公开的。

2. 欧盟会议翻译服务处 (JICS)

JICS 为欧盟各部门服务,也为分散在欧洲各地的机构服务。JICS 在 EMEA 设立了一个代表处,为欧盟召开的会议提供翻译服务。JICS 专门建立了 EMEA 专业和技术词汇表,以提高 EMEA 会议的同声传译的质量。

3. 欧洲药品质量管理部 (EDQM)

《欧洲药典》(EP) 是 1964 年由比利时、法国、德国、意大利、卢森堡、荷兰、瑞士和英国共同在欧洲大会委员会的组织下编写的,它对各国的药典进行了规范。《欧洲药典》有 26 个签约方 (15 个成员国、欧洲共同市场、欧洲 10 个其他国家)。《欧洲药典》取代了各国旧药典,具有法律效力。75/318/EEC 指令要求欧盟药品制造商进行申报时必须符合药典要求。EMEA 作为欧盟代表,参与欧洲药典委员会的日常工作。

4. 欧洲官方药物实验室网络 (OMCL)

OMCL 是由欧盟和欧洲理事会共同建设的,促进了欧盟和 EFTA 成员的实验室之间的合作。1999 年,EMEA 和 EDQM 签订了一项合同,通过 OMCL 网络来收集、检测集中管理的药品。

欧洲审批程序

欧盟有两套在不同国家获得上市批准的程序,分别是集中程序和分散程序 (也称互认程序)。

1. 集中程序

集中审批程序是针对生物制品、一些高科技产品和新的活性药物成分的 (如从未上市过的药品),是根据理事会法规 (EEC) No. 2309/93^[7] 和 93/41/EEC^[9] 指令建立的。

集中程序规定,全欧洲只需要一个上市批准,原则上只需要进行一次审批。大会报告起草人和辅助起草人是 CPMP 的成员,他们被指定负责撰写 CPMP 的特定文件。每一个 CPMP 成员都要轮流成为起草人。

提交文件之前,申办单位要向 CPMP 或 CVMP 表明自己要提交注册申请的意图,并预约指派一位大会报告起草人。如果申办方向本国卫生部门提出这样的申请,它可以要求委派一名 CPMP 或 CVMP 成员作为起草人。CPMP 和 CVMP 没有义务满足它的要求,但大多数情况下指派的起草人都是申办单位要求的人选。

提交文件以后,起草人和辅助起草人有 120 天时间对文件进行审查,并撰写评估报告草稿。然后合作各方将会对两份评估报告进行讨论,并就其中突出的问题列表回馈申办方。申办方提交问题的答案后,起草人将花 30 天时间完善评估报告,并提交给 CPMP 或 CVMP。CPMP 或 CVMP 成员将得到档案文件的第一部分的复制版,并且可以要求得到档案文件的完整版。该过程将花费 210 天,CPMP 或 CVMP 将做出决定:批准或不批准。

若 CPMP 批准,将进入集中程序的第二阶段——决策阶段。在决策阶段,委员会将检查药品审批当局是否遵守区域法律,并保证所有成员国都接受审批当局的决定。若 CPMP 不批准,申办方可以进行上诉,60 天内 CPMP 要准备第二份意见。

CPMP 将用 11 种欧盟官方语言向欧盟委员会的药品部门提交审批意见、药品的特性总结、药品生产商详情和药物原料生产商详情、标签及包装。欧盟委员会有 30 天时间准备决定草案。30 天内,欧盟委员会将听取委员会各总署的意见。

决定草案将提交给药品常务委员会或兽药常务委员会。成员国可以持有不同意见,如果反对意见是科学的,常委会发回 CPMP。如果意见不是科学的,将举行一次投票,然后由委员会按投票情况做出决定。每个成员国依据国家大小和重要程度拥有不同的投票数,票数多的意见将被采纳。如果 30 天内没有反对意见,决定草案将上报欧盟委员会秘书处,由企业和信息委员会宣布最终决定。最终决定将刊登在欧盟官方杂志上。

2. 分散程序

分散程序是建立在互相承认的基础上的。依据 65/65/EEC^[1] 和 75/319/EEC^[3] 指令,理事会 93/39/EEC^[8] 指令将在各成员国实施。申办者向一个成员国的卫生当局提交申请,并申请文件互认。210 天之内,被申请国 (RMS) 应批准该申请,并出具评估报告。这段时间内,申办方将不会获得更多的信息。

申办者可以向任何一个或几个成员国提交互认申请。被申请国将评估报告的复印版送交相关成员国。90 天内,成员国可以提出反对意见,如果 90 天内没有反对意见,相关成员国将宣布该国的上市批准。

为了推动互认程序,建立了互认促进工作组 (MRFG) 和兽药互认促进工作组 (VMRFG)。这两个工作组将在每一次 CPMP 或 CVMP 会议之前举行一次会面,就反对意见进行组内讨论,被申请国希望就文件和标签的审批意见达成一致。如果有必要,还可以与申办方一起讨论标签的

细节。

若 MRFG 或 VMRFG 内部不能达成一致, 将向 CPMP 或 CVMP 寻求建议。此后的程序和集中程序相同——30 天内必须做出审批决定。

3. 提名与仲裁

根据 75/319/EEC 指令, 申办方或国家当局应向 EMEA 提名, 以保证根据一国法律已经批准的药品的特性总结在所有成员国都一致。

同样, 如果有特殊的公共卫生要求, 如药物警戒数据, 国家批准的药品或通过互认程序批准的药品将参照 75/319/EEC 指令的第 12 或 15 条, CPMP 或 CVMP 将对其进行变更、中止、收回。

参考文献

1. Official Journal of the European Communities N° 022, Feb 9, 1965, 0369—0373.
2. Official Journal of the European Communities N° L 147, June 9, 1975, 0001—0002.
3. Official Journal of the European Communities N° L 147, June 9, 1975, 0013—0022.
4. Official Journal of the European Communities N° L 147, June 9, 1975, 0023—0024.
5. Official Journal of the European Communities N° L 332, Nov 28, 1983, 0001—0002.
6. Official Journal of the European Communities N° L 15, Jan 17, 1997, 0038—0041.
7. Official Journal of the European Communities N° L 214, Aug 24, 1993, 0001—0002.
8. Official Journal of the European Communities N° N L 214, Aug 24, 1993, 0022—0030.
9. Official Journal of the European Communities N° L 214, Aug 24, 1993, 0040.
10. EU <http://europa.eu.int>, <http://europa.eu.int/eur-lex>.
11. Pharmaceuticals in the EU. <http://pharmacos.eudra.org>, <http://www.eudraportal.eudra.org>, <http://emea.eu.int>, <http://perf.eudra.org>.
12. National Agencies. <http://heads.medagencies.org>, <http://hevra.org>.
13. ICH. <http://www.ich1.org/ich1.html>, <http://vich.eudra.org>.
14. European Pharmacopoeia. <http://www.pheur.org>.

(陈桂良 洪赞飞 译)



P

泡腾制剂

Nils-Olof Lindberg

Pharmacia AB, Helsingborg, Sweden

Henri Hansson

Galenica AB, Meleön, Malmö, Sweden

引言

泡腾片剂系指含有酸性物质和碳酸盐或碳酸氢盐的一种非包衣片剂,遇水能快速反应产生二氧化碳。通常给药前将其溶解或分散在水中^[1]。

人们了解泡腾混合物已经有 250 多年了。早在 20 世纪 30 年代,Alke Seltzer 就已经成功地使泡腾产品(包括片剂)成为时尚^[2]。有关泡腾片已有所综述^[3~5]。

泡腾反应也应用在其他剂型中,如(泻药类)栓剂、阴道栓(主要起到避孕作用),以及一些药物传递系统(比如漂浮系统和口腔速崩片)。

泡腾产品应该储藏在密闭容器中,容器中常常添加干燥剂。

药典各论

可溶性泡腾片用压片法制备。除活性成分之外,还包括溶于水中能产生二氧化碳的酸混合物(枸橼酸、酒石酸)和碳酸氢盐(NaHCO_3)^[6]。《美国药典》(USP) 24 版收载以下 7 种泡腾产品:对乙酰氨基酚的泡腾口服溶液;阿司匹林口服溶液泡腾片;碳酸氢钾口服溶液泡腾片;碳酸氢钾氯化钾泡腾口服溶液;碳酸氢钾氯化钾口服溶液泡腾片;碳酸氢钾和碳酸氢钠枸橼酸口服溶液;氯化钾、碳酸氢钾和枸橼酸钾的口服溶液泡腾片^[7]。

泡腾片以及泡腾颗粒剂和散剂在《欧洲药典》中也有记载,尽管还没有收载任何品种专论^[1,8]。

泡腾反应

许多年来,碱金属碳酸氢盐和枸橼酸或酒石酸之间的酸碱反应被用来制备药物制剂。这样的制剂在加水后立即泡腾。这些制剂在溶液中释放的二氧化碳量大于溶液中二氧化碳的大气压饱和溶解度。如果酸首先溶解,反应就发生在未溶解的碳酸氢盐颗粒表面的饱和溶液中。如果碳酸氢盐溶解得较快,反应实际上发生在未溶解的酸性物质表面。这种混悬体系不利于形成二氧化碳饱和溶液,因为这些固体小颗粒可以作为产生气泡的核^[9]。

原料

1. 一般特征

泡腾剂中原料的可压性和黏结性与对普通片剂的原料要求相似。但是,黏结性差的原料无法加入黏合剂来弥补,因为黏合剂会影响泡腾片在溶液中的快速溶解。当然,黏合剂的加入也不是泡腾片或泡腾颗粒溶出的决定因素。

普通片剂的压制过程包括一系列的步骤:重新排列;初始颗粒的变形(弹性,塑性);破裂;碎片的变形。颗粒表面非常接近,形成粒子间引力或键^[10]。泡腾片也会出现相同的情况。

泡腾产品所用原料的一个重要特征就是其吸收和解吸等温线,即含水量。为了避免泡腾片提前发生泡腾反应,使用的物质必须都是低含水量的。泡腾产品所用原料的另一个重要特征是水溶性。使用容易湿润的原料也很重要。当然,所用原料的味觉也是重要的。

2. 酸性材料

获得泡腾反应的酸度有三种途径:酸、酸酐和酸性盐。传统的酸性物质为有机酸、柠檬酸和酒石酸;然而也使用一些酸性盐。

2.1 酸

枸橼酸:枸橼酸通常是单水合物或无水合物。枸橼酸有各种不同的粒度,为无色透明结晶或白色颗粒状结晶性粉末。无臭,有强烈的酸味。能溶于少于 1 份的水中和 1.5 份的乙醇中^[11]。

枸橼酸一水合物在 100℃ 熔化,75℃ 失水,135℃ 变成无水合物,153℃ 熔融。25℃,RH 小于 65%,开始风化;RH 低于 40% 时形成枸橼酸无水合物。RH 在 65%~75% 时,它几乎不会吸潮,RH 增加时,就会出现明显的吸潮现象(图 1)^[11]。

图 1 也包括了无水合物的吸湿曲线。在分解过程中,无水合物在 135℃ 开始熔化^[12],RH 达到 75% 时,形成单水合物^[11]。

Heckel 图显示无水枸橼酸主要在压片过程中破碎^[13]。在减压时弹性形变和弹性回复都比较小^[14]。

酒石酸:1 份酒石酸能溶于 0.75 份的水,2.5 份的乙

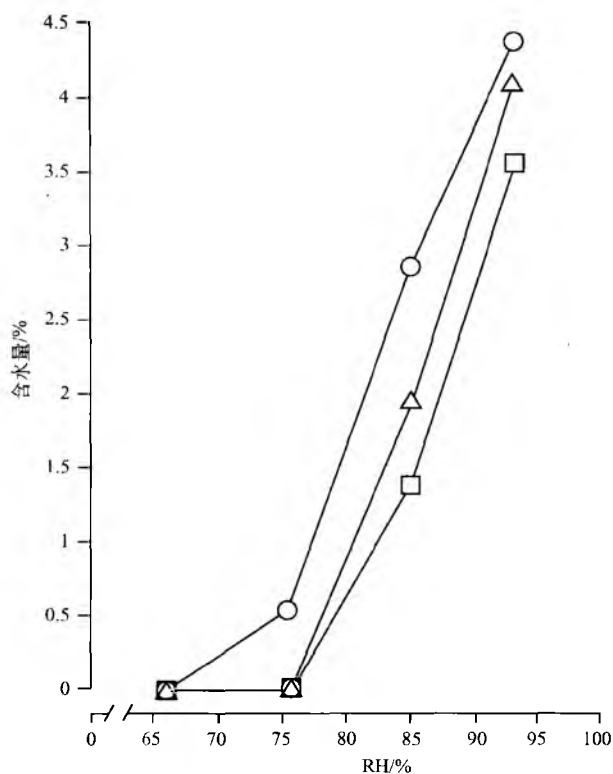


图1 一些吸湿性酸的吸附等温线^[16]
 ○枸橼酸一水合物；△无水枸橼酸；□酒石酸

醇^[15]。在RH低于65%时不吸潮，而在RH高于75%时则明显吸潮（图1）。

研究显示：酒石酸与无水枸橼酸的性质相似。在压制过程中，酸大部分破碎，弹性形变和弹性回复比较小^[14]。

比较化学计量相当的无水枸橼酸、维生素C或酒石酸和NaHCO₃的泡腾片所产生的二氧化碳显示：无水枸橼酸和维生素C的性质比较相似。然而，酒石酸产生的二氧化碳最多，但崩解时间较长^[16]。

维生素C：维生素C为白色至浅黄色结晶性粉末或为无色晶体，无臭，有强烈的酸味。不易吸潮。在光照下，逐渐变深。1份维生素C能溶于3.5份的水，50份的乙醇^[17]。

维生素C在受压时出现中等程度的破碎。相对低的片剂硬度显示其引力相对较弱，抵抗压力释放和弹性回复的程度不高^[18]。

维生素C能够作为酸性材料。从维生素C和NaHCO₃混合物中释放二氧化碳的速度与枸橼酸或酒石酸和NaHCO₃的组合相当。因为维生素C的吸湿性比枸橼酸和酒石酸弱，因而在没有空调的环境中，可以将其作为制备泡腾片的唯一酸源^[19]。

富马酸：富马酸是白色、无臭或几乎无臭的结晶性粉末。1份能溶于222份的水或28份的乙醇^[20]。吸附等温线显示富马酸是一种不易吸湿的物质^[16]。

阿司匹林：虽然阿司匹林是一种常以泡腾剂型出现的药物，但由于其水溶性较小，不能作为酸性材料，需另加酸来减少反应时间。

其他酸：苹果酸具吸湿性，在水中易溶。已被推荐应用于泡腾剂中^[3]。

其他的酸已在相关的泡腾产品中提及^[3,5]。

2.2 酸酐

人们研究了用酸酐作为酸的前体，但在上市产品中的使用受到一定限制。

2.3 酸性盐

氨基酸的盐酸盐在溶液中也会产生酸。然而，这些材料价格比较昂贵，又很容易吸潮^[4]。其他推荐使用的酸性盐有：枸橼酸二氢钠^[21]，一种非吸湿性物质^[16]；枸橼酸氢二钠，在20℃，RH低于93%时为非吸湿性物质^[16]；磷酸钠，在水中极易溶解。

3. 二氧化碳的来源

碳酸盐和碳酸氢盐都可以作为二氧化碳的来源，但后者较常用。

碳酸氢钠（NaHCO₃）：NaHCO₃无臭，为白色结晶性粉末，有淡淡的碱味。粉末和颗粒有各种粒度。二氧化碳的产生率可以达到52%（质量百分比）。室温RH不低于80%时，其含水量小于1%。RH超过85%时，迅速吸收过量的水分，并开始分解。20℃时，水中溶解度为1:11，在95%乙醇中几乎不溶。当加热到250~300℃时，碳酸氢钠分解，转化为无水碳酸钠。然而，这个过程取决于时间和温度，大约从50℃开始。反应遵循表面控制动力学，将碳酸氢钠晶体加热较短时间，在表面可以得到非常细小的无水碳酸钠针状晶体^[22]。

在潮湿的空气中，随着Na₂CO₃·NaHCO₃·2H₂O结合物的形成，NaHCO₃缓慢地脱去碳酸基^[23]。

NaHCO₃主要是通过塑性形变，而不是通过破碎固结^[18]，是非弹性物质^[13]。

为了克服NaHCO₃流动性不好和可压性差的缺点，一般采用喷雾干燥技术。通过加入其他一些辅料，如聚乙烯吡咯烷酮和硅油，就可以得到具有直接可压性的喷雾干燥NaHCO₃。产品不需转化为碳酸钠，仍然具有良好的可压特性^[24]。

碳酸钠：市售碳酸钠一般为无水、单水或十水合物。所有的形式均易溶于水，无水合物有吸湿性^[25]。

碳酸氢钾：碳酸氢钾（KHCO₃）极易溶于水。加热到约200℃时，分解成碳酸钾、水和二氧化碳^[26]。所以，KHCO₃干燥时对热的敏感性小于NaHCO₃。20℃，RH大于80%时，KHCO₃吸收大量的水。

碳酸钾：有人研究了碳酸钾在泡腾片中的排湿作用^[27]。

碳酸钙：沉淀碳酸钙为细小的白色粉末或晶体，无臭

P

无味。在水中和乙醇(95%)中几乎不溶。沉淀碳酸钙为非吸湿性物质^[28]。碳酸钙密度较高,但是可压性较差^[29],通过破碎固结^[30]。

其他物质:氨基酸-碱金属的碳酸盐衍生物,如甘氨酸碳酸钠,可以作为二氧化碳的来源。

甘氨酸碳酸钠是非吸湿性物质,耐热,较稳定^[31]。然而,二氧化碳的产率约为18% (w/w),仅是 NaHCO_3 的1/3。

产品

1. 剂型

泡腾片^[1,6]、颗粒和粉末^[8]均收载于药典中,也已经有上市产品。泡腾片与普通口服固体剂型相比具有许多优点。作为一种可口的发泡溶液服用,它适合于吞咽片剂和胶囊有困难的患者。既然药物作为溶液给药,那么与溶出有关的问题,如吸收速率和生物利用度低等,就都可以避免了。在水溶液中储存不稳定的药物,在泡腾制剂中就变得稳定。

与水溶液和普通片剂相比,泡腾制剂也存在一些缺点。例如,由于使用大量的价格较高的辅料和需要特殊的生产设备,泡腾制剂的成本较高,而且制剂中 K^+ 或 Na^+ 的浓度较高。此外,虽然泡腾片的小包装使得其携带比较方便,但与普通片剂相比,泡腾片的体积仍较大。另外,有时改善泡腾制剂中有异味的药物非常困难。

将泡腾制品投入一杯水中,酸和 NaHCO_3 的反应非常迅速,通常在1min或更短时间内完成反应^[32]。除了传统泡腾制剂外,泡腾反应还应用于其他剂型中。已经有人全面研究过产生二氧化碳的泡腾缓泻剂^[33]。其中一个产品已在瑞士上市多年。阴道泡腾栓剂也有报道^[34]。有人研究了口服的脉冲和胃漂浮给药系统,由药物的泡腾片芯和聚合物包衣组成^[35]。

2. 药物(产品分类)

许多药物和药物成分都可以用来制备泡腾制剂。部分列出如下:

阿司匹林(乙酰水杨酸)是许多不同的泡腾制剂中常用的药物^[36,37]。

扑热息痛(对乙酰氨基酚)是另一种用于泡腾制剂的止痛剂^[38]。

由另一种镇痛药布洛芬制成的泡腾制剂已有产品上市。

在泡腾抗酸剂中,Alka-Seltzer,一种抗酸的镇痛泡腾产品在20世纪30年代就已经开始使用。单纯抗酸的泡腾剂也在很多国家上市了。

0.5~1g的抗坏血酸泡腾片,是非常有名的产品。其中还包括其他的维生素、钙和矿物质。

乙酰半胱氨酸,一种溶真菌剂,作为扑热息痛过量的解毒剂,有泡腾片上市。

水不溶性药物的泡腾制剂也有生产。一个成功的例子

就是茶碱中毒后使用的活性炭泡腾制剂^[39]。

3. 电解质平衡的考虑

泡腾片常含有高浓度的钠。在瑞士大部分镇痛剂产品中,钠的含量达到了15mmol。这样的含量可能会在一些患者(如由充血性心力衰竭或肾衰引起的钠潴留患者)中禁忌使用。另外,对于泡腾片中钠盐的含量还有限制。

4. 生物药剂学方面

当以水溶液给药时,药物通过胃肠道的吸收迅速。虽然药物溶液在胃液中的稀释有时会导致沉淀的产生,但是极细小的沉淀物还可以快速重新溶解^[40]。例如,镇痛的泡腾制剂的设计依据就是水溶液吸收快速。而且,由于没有胃肠道中的崩解和溶出过程,药物的吸收有望均匀一致。

泡腾剂也会引起体内的生理变化。二氧化碳气泡直接接触肠道上皮细胞,改变了细胞间的通路,从而提高了药物的透过率。除了液体流动和膜的疏水因素外,这也是提高药物转运的因素^[41]。

通常认为缓冲阿司匹林泡腾片比普通片剂具有更小的胃黏膜刺激性,引起的胃肠道失血也较少,这个观点受到质疑。

对于三种不同的阿司匹林制剂,两种具有不同缓冲能力的泡腾片和一种普通片,对健康志愿者的生物利用度研究发现,所有制剂均达到了完全的吸收。两种泡腾片均吸收迅速。缓冲能力不影响吸收速率^[36]。

在健康志愿者身上比较了阿司匹林泡腾剂、可溶阿司匹林,以及加入足量的 NaHCO_3 使其与阿司匹林泡腾剂具有相同缓冲能力的可溶阿司匹林,在服药之后,在所有时间点血浆中阿司匹林浓度没有明显区别^[37]。

在普通志愿者身上比较了扑热息痛泡腾制剂与普通片剂的体内吸收,发现泡腾制剂的吸收速度和比普通制剂更快、更均匀。这具有重要的治疗意义,可以达到预期的快速止痛效果^[38]。

对布洛芬泡腾片和普通糖衣片的生物利用度进行了比较。布洛芬泡腾片的吸收速度较快,但两者血浆峰浓度和药时曲线下面积没有差别,即生物等效^[42]。

工艺

1. 环境

泡腾片的生产需要对环境进行严格的控制。早在20世纪30年代,人们就知道必须将整个车间的RH控制在20%以下。此外,还需保持21℃恒温^[2]。

在25℃或更低的室温下,RH不超过25%时,可以避免由于空气潮湿所引起的问题^[3]。

2. 设备

如果考虑到空气湿度的影响,一般的生产设备(混合



机、制粒机、旋转压片机、干燥机、研磨机)都可以用来生产泡腾片。通常,除了含有足够量的自身润滑剂(如乙酰水杨酸)的片剂外,压片工艺必须进行改良以适应泡腾产品。

3. 湿法制粒

泡腾剂的酸和碱可以分开制粒,也可以将其与水(枸橼酸的结晶水、液体水或水蒸气)、乙醇(可能已经用水稀释)、异丙醇或其他溶剂润湿混合后制粒。

当采用非水溶剂湿法制粒时,倘若原料干燥,且制备过程在低湿度环境下进行,那么不会发生泡腾反应。而枸橼酸会部分溶解于乙醇或异丙醇中,当溶剂挥发后,即成为一种黏合剂。

当制粒时使用的溶剂含水或是纯水时,就会发生泡腾反应。必须注意严格控制这一过程。由于真空条件可以控制泡腾反应和干燥过程,所以较为有利。

使用熔融法制粒时,泡腾剂混合物加热到约 100℃(一水合物的熔点),结晶水就会从枸橼酸中释放出来。这个过程是偶发的,很难控制,尤其在静止状态下^[3]。

利用高速剪切搅拌机在混合过程中产生的热量,可以熔融法制备 60~300kg 的泡腾颗粒^[43]。

将枸橼酸润湿,加入到 NaHCO₃ 中,便会发生局部湿润融合,在适当的搅拌器中揉捏便形成颗粒。当颗粒还潮湿时就压片,润湿的枸橼酸具有润滑作用。压好的片子立即转移到烘箱中,70~75℃干燥。干燥过程能使片剂变得坚硬。片剂一经拿出烘箱,就立刻包装入镀铝聚乙烯的铝箔中^[44]。

当在高速剪切搅拌机中用水将混合物料制粒以及将湿粒真空干燥时,可以通过 X 射线衍射和红外光谱法(IR)检测枸橼酸和 NaHCO₃ 的泡腾反应。干燥前的接触时间随含水量的不同而不同。在含水量较低时,改变接触时间不会改变枸橼酸。然而,当含水量较高时,就会出现单水合枸橼酸、双水合枸橼酸和三水合枸橼酸等。尤其是当产生双水和三水合枸橼酸时,就会发生制粒过程二氧化碳的损失现象^[45]。

泡腾颗粒可在流化床制粒/干燥装置中制备^[46]。

药物可以与泡腾颗粒和其他辅料或一部分颗粒相混合。当药物比例较小时,要考虑到药物和颗粒有可能发生离析现象。

4. 干法制粒

预制压片法(用重型压片机压制预制片或较大片子)或滚筒压片制粒法,适合于不能用湿法制粒的材料。预制片和原料通过滚筒压片机制成合适大小的颗粒。预制压片过程中通常需要加入润滑剂,但碾压法不一定需要。酸性和碱性组分可以分别或一起干法制粒。

5. 直接压片

一些泡腾片剂产品可以通过直接压片法制备(如阿司

匹林)。直接压片要求对原、辅料的选择较为讲究,从而获得流动性好、不易分层、可压性好的混合物。泡腾片直接压片与普通片剂存在相同的问题。

6. 压片

通过外加润滑剂,使用单冲压片机压制泡腾片的可能性已有报道^[5,47]。通常只有旋转压片机应用于泡腾片的大工业化生产。压片机制造商将现有的设备进行改良,从而避免由于内加润滑剂和黏冲带来的问题。因此,许多泡腾片通过外加润滑剂法采用旋转压片机生产,液体或固体润滑剂均可使用。

处方

1. 辅料(包括甜味剂和矫味剂)

1.1 润滑剂

泡腾产品的理想润滑剂(或总称为附加剂)无毒,无味,具有水溶性。传统的润滑剂很少能满足这些要求。

内加润滑剂是加到粉末混合物中,因而包括在处方中。当润滑剂以固体形式加入时,润滑剂必须粉碎。

硬脂酸金属盐,如在普通片剂中使用的润滑剂硬脂酸镁或钙,由于其不溶于水,很少用于泡腾片中。硬脂酸盐的使用会使得混浊的液体表面出现不溶性、泡沫状、肥皂味的表面层。此外,硬脂酸盐的常规使用浓度也使得片剂疏水,以致泡腾片的水溶性降低。然而,使用极低浓度的硬脂酸盐可以提高泡腾片的溶解速率,因为它能使片剂在溶解过程中仍然浸入水中,而不加硬脂酸盐,泡腾片则会浮在水面。漂浮在水面的片剂与水的接触面积小于完全浸入水中的片剂。

硬脂酸钠和油酸盐在低浓度时均是水溶性的。它们也具有特异的肥皂味,事实上这妨碍了它们在泡腾剂中的使用。

4%的聚乙二醇(PEG)6000 和 0.1%的硬脂酰富马酸钠的联合使用对于小规模直接压片法制备抗坏血酸片剂,能起到很好的润滑效果^[48]。在泡腾片中也推荐使用氯化钠、乙酸钠、D, L-亮氨酸(水溶性润滑剂)等润滑剂^[44]。

采用标准泡腾片处方直接压片,检测了 20 种泡腾片润滑剂的润滑效果。与传统片剂润滑剂相比,泡腾片润滑剂的浓度较高。增加润滑剂浓度和压片强度,大部分润滑剂的效果增强。在泡腾剂处方中使用的润滑剂需要结合疏水性和亲水性,以达到良好的润滑作用和较短的崩解时间。中等极性的润滑剂最佳。有人选择用富马酸作为润滑剂,并选择了合适的浓度^[49]。其他有关泡腾产品润滑剂的研究显示,喷雾干燥的 L-亮氨酸和 PEG 6000 的最佳浓度分别为 2%和 3%^[50]。

表面活性剂(如十二烷基硫酸钠和十二烷基硫酸镁)也可以用作润滑剂。

P

外加润滑剂的使用原理是：把润滑物质，一般为石蜡油，涂在压片机器表面。一种方法就是将浸油的布垫圈放在下冲的顶端。在每个药片出冲时垫圈都可以擦拭模具内腔。为了避免药片黏冲，聚四氟乙烯或聚氨酯等物质常涂于冲表面。另一种润滑剂的加入方法是，在一个药片出冲后、另一个药片的颗粒填充前，将润滑剂（液体或固体润滑剂）喷到机械表面，形成薄层。

含有乙酰水杨酸的产品通常不需要使用润滑剂。

1.2 助流剂

通常不需要助流剂。流动性好的颗粒，物理性状适合直接压片的辅料，以及直径较大的片剂一般都可以不加助流剂。

1.3 抗黏着剂

颗粒或粉末混合物对冲头表面的黏着，即所谓的起毛，可以通过使用垫片（如将聚四氟乙烯或聚氨酯置于冲头的表面）而消除。

1.4 黏合剂

黏合剂是制备普通片剂常用的辅料。黏合剂或者以干粉形式加入，或溶解于合适的溶剂在湿法制粒过程中加入。大部分黏合剂都是聚合物，能增加处方的塑性形变。

黏合剂的使用通常会阻碍泡腾片的快速溶解。因此，许多泡腾片不使用黏合剂。然而，与普通片和泡腾片相比，泡腾颗粒具有较大的表面积，因而可以在处方中加入黏合剂而快速溶解。由无水柠檬酸和 NaHCO_3 组成的泡腾颗粒是用无水乙醇制粒的。在结块过程中部分溶解的柠檬酸可以作为黏合剂^[51]。

为了压制抗坏血酸和 NaHCO_3 组成的片剂，需要先制粒。普通水溶性黏合剂，如聚乙烯吡咯烷酮（聚维酮）或聚乙烯吡咯烷酮-聚乙烯醋酸纤维素共聚物，会引起抗坏血酸颗粒颜色的变化。从大量的糊精和麦芽糖糊精中，选用含有大量麦芽糖醇的氢化麦芽糖糊精作为可能的黏合剂。麦芽糖醇是抗坏血酸泡腾片剂的合适黏合剂。麦芽糖醇形成晶体桥接，可能是其产生黏合作用的机理^[19]。PEG 6000 既可以作为黏合剂，也可以作为润滑剂。

1.5 崩解剂或溶出辅助剂

崩解剂，在普通片剂中常常使用，但在泡腾片中不常用，因为泡腾片上市的其中一个要求是，当泡腾片放入一杯水中，几分钟后即成澄清的溶液。

1.6 稀释剂

泡腾产品中通常不需要加入稀释剂。因为泡腾剂的本

身加入量较多。

1.7 甜味剂

泡腾产品中可以使用蔗糖和其他天然的甜味剂，如山梨醇。尽管人造甜味剂比较常用，然而，人造甜味剂的使用是受卫生组织限制的。所以，这些甜味剂的使用随各个国家标准的不同而有所不同。

糖精或糖精的钠盐和钙盐常用作甜味剂。天冬酰苯丙氨酸甲酯也常用作泡腾片的甜味剂。早期，环己氨基磺酸盐和环己氨基磺酸是可以选用的人造甜味剂，但是其使用受到某些限制。

1.8 矫味剂

简单使用甜味剂不足以改善含药制剂的不良口味，因此还要使用矫味剂。各种干燥矫味剂可从供应商直接获得。使用的矫味剂必须具有水溶性或可在水中分散。

1.9 着色剂

可以添加水溶性着色剂。然而，一些色素会根据 pH 的变化而改变颜色，在选择色素前必须考虑这一点。

1.10 表面活性剂

这种辅料有时用于增加药物的可湿性和溶解性，但必须注意会形成泡沫。

1.11 消泡剂

为了减小泡沫的形成，从而防止药物黏附在玻璃杯壁上，通常使用消泡剂，如聚二甲硅氧烷。但是，消泡剂通常不是泡腾产品的必要组成。

2. 处方筛选（包括最优化）

有关泡腾产品处方筛选的文献比较少。表 1 列出了北欧上市的一些泡腾产品。

在阿司匹林泡腾片剂制备中使用了部分析因设计，根据最快上升途径决定片剂制备的最佳条件^[53]。

通过五种不同处方研究片剂的生产条件、处方、压片力、储存条件和储存时间的影响^[54]。用析因设计研究两个处方因素（枸橼酸与 NaHCO_3 的比例和聚维酮的含量）和两个与颗粒大小、粉末含量和片剂溶出速率有关的工艺因素（温度和流化空气的速度）的影响。此外，通过最快上升途径优化重要因素的水平^[46]。

用熔融法制备水不溶性药物的固体分散体。枸橼酸以各种比例和 NaHCO_3 混合作为药物的载体^[55]。

表 1 北欧上市的一些泡腾片剂的组成, 各组分及其每片用量^[52]

产品 A			产品 B		产品 C	
	组分	每片用量/mg	组分	每片用量/mg	组分	每片用量/mg
药物	维生素 C	1000	阿司匹林	500	对乙酰氨基酚	500
			咖啡因	50		
辅料	无水枸橼酸	700	无水枸橼酸	500	无水枸橼酸	1200
	碳酸氢钠	490	碳酸氢钠	1250	碳酸氢钠	1550
	PEG 6000	45	多库酯钠	0.85	聚维酮	25
	山梨醇	25	苯甲酸钠	0.15	环己(烷)氨 (基)磺酸钠	45
					糖精钠	5
	糖精钠	12			柠檬香精	25
	维生素 B ₂ 磷酸钠	1			硬脂酸镁	1.4
	橘子香精	2				



3. 稳定性

泡腾产品最大的问题就是制剂如果过早暴露在潮湿环境中其反应性会逐渐减小(即泡腾系统的稳定性)。此外, 药物与一些辅料的稳定性, 如矫味剂, 也需要考虑。

泡腾产品在潮湿环境中不稳定。大部分泡腾产品如果包装不适宜, 都是吸湿性的, 能够吸收足够的水分并分解。

用等量的 NaHCO₃ 和酒石酸制备的片剂在 70℃ 储存。在封闭系统, NaHCO₃ 和酒石酸会发生反应。当片剂储存在开放系统中, 由于 NaHCO₃ 的分解, 会产生质量损失现象^[56]。

如果 NaHCO₃ 部分转变成相应的碳酸盐, 泡腾成分就会稳定得多。通常, 2%~10% 的碳酸氢盐转变为碳酸盐时就可以获得理想的稳定性^[57]。添加碳酸钠本身不能提高稳定性。而加热碳酸氢盐可以提高稳定性的第一种解释就是, 加热使碳酸盐均匀地分布在碳酸氢盐的表面, 由此制剂的水清除能力有所提高。第二种解释是由碳酸氢盐晶体分解产生的碳酸钠晶体总是比加入碳酸钠晶体(尽管通过研磨粉碎)细小得多。第三种解释是可能形成了复盐, 它们是比较碳酸盐本身更好的消除剂^[56]。碳酸钾的湿气清除作用得到了确认, 并在特定处方中优化了其浓度^[27]。

通过析因设计试验评价了三种市售泡腾剂和一种阿司匹林分散片的稳定性。温度影响所有片剂的水解, 而湿度会影响塑料管包装的一种产品和铝管包装的另一种产品^[58]。

使用汞式孔隙分析仪和悬臂梁式称量传感器监测所选泡腾片剂系统的稳定性。质量测试可以获得反应的指数。孔隙率测量有利于说明片剂小孔结构随时间而改变。当使用非吸湿性材料时, 压片强度和产生条件不是影响泡腾系统稳定性的重要因素^[54]。

对乙酰氨基酚-可待因泡腾片中, 磷酸可待因在室温下会与枸橼酸反应, 产生可待因的枸橼酸酯。在更高的温度

下, 固态酯化反应已被证实。酒石酸也会与磷酸可待因发生类似的非溶剂化反应生成酯^[59]。

生产

1. 制粒

在瑞典赫尔辛堡的制药厂, 每天大约生产 1200kg 的泡腾颗粒。无水枸橼酸和 NaHCO₃ 在行星式搅拌机中用乙醇润湿, 湿颗粒在盘中干燥。另外的泡腾颗粒在真空设备中(Topo 制粒机)制备, 在这种设备中水是主要的润湿剂。Topo 制粒机是用来在真空状态下制粒和包衣的, 也可以作为封闭系统进行混合、造粒、干燥以及搅拌/过筛。

通过加热使得水合枸橼酸释放结晶水而达到润湿作用的熔融法, 通常使用高速剪切搅拌机产生热量而得以实现^[43]。批产量达到 60~300kg。

无水枸橼酸和 NaHCO₃ 在双螺杆挤出机中与乙醇制粒, 粉末加料速度达到 60~90kg/h^[51]。

在泡腾颗粒的生产中也使用流化床包衣-反应技术。

2. 压片

泡腾片通常用外加润滑剂的设备生产。绝大部分压片机生产商都能将这种设备添加到旋转压片机上。含有高比例的阿司匹林的产品可以不用传统的润滑剂来生产, 因而可以使用常规的旋转压片机。在瑞典赫尔辛堡的 Pharmacia 工厂, 阿司匹林泡腾片就是用普通的高速旋转压片机生产的。

因为潮湿的枸橼酸可以作为润滑剂, 所以当泡腾颗粒潮湿时可以直接压片。将压好的片剂立即转移至烘箱干燥。干燥可以提高片剂的硬度^[44]。

压片器具通常使用几种钢制成。富含镍的钢材具有最强的抵制盐酸盐腐蚀的能力, 不过其他因素, 如湿度、温

P

度和接触时间,也会影响机器材料的耐腐蚀能力^[60]。当订购和管理泡腾片的工具材料时,这些信息是有用的。

泡腾混合物的压制通常会导致严重黏冲。使用表面涂聚四氟乙烯的平冲,可以克服黏冲的问题^[61]。其他抗黏材料,如 Vulkollan[®] (一种聚乙烯)、Hostalit[®] (聚氯乙烯)和 Resopal[®] (一种蜜胺),也已经使用^[62]。塑性材料的垫片用黏合剂或胶带黏附在冲表面。应该注意的是,在压片过程中,聚合物会变成碎片磨掉。

用四种不同的处方 [含有酒石酸和 (或) 枸橼酸与 NaHCO_3 , 以及聚维酮和 PEG 6000] 生产四种泡腾片。通过电子显微镜、表面粗糙程度测定及压片过程中冲模质量的变化衡量每个处方对冲头的黏附情况。基本处方本质上都会有黏性,产生一种不牢固的多孔状结构;所得片剂比传统的非泡腾压制片要粗糙。含有酒石酸的两个处方制备的片剂比单独使用枸橼酸的两个处方制备的片剂黏冲现象要少,表面粗糙程度也要低一些。加入一种水溶性的蔗糖酯很有益处,特别是对于黏冲比较严重的处方^[63]。

3. 生产过程中的质量控制

为了快速测定干燥失重,可以使用红外干燥天平。泡腾颗粒的大小分布用筛子分析进行控制。

在泡腾片压制过程中,通常会用过程测试来监测这一过程。这些测试包括片重、片重差异、片剂厚度、片剂脆碎度、崩解和片剂外观的控制。脆碎度和溶液 pH 也要测定。通常应用电子装置来监测片重。

当使用塑性垫片时,在片剂生产过程中要对冲头进行检测。检测能保证塑性垫片的完整,例如,要避免对垫片的损伤或磨损。

4. 产品评价

当评价泡腾产品时,必须考虑化学和物理特性。在本文中,除非化学性质特别受泡腾基质的影响,才对物理性质进行讨论。至于更多的细节,《欧洲药典》还包括泡腾片^[1]和泡腾颗粒^[8]的特殊崩解实验。

许多测试 (如滴定、质量分析、比色,以及容量分析、失重测试和压力测定) 都可以用来检测二氧化碳的量^[16,48,64]。基于检测二氧化碳压力产生和失重的方法已经开始应用^[16,65]。

失重检测的结果已经模型化^[65]。研究显示,在二氧乙烷提取后,通过 Karl Fischer 分析检测泡腾片中的水分含量是可能的^[66]。和 Karl Fische 试剂反应的 NaHCO_3 在二氧乙烷中不溶,不会干扰检测。

泡腾产品中的水分采用近红外检测法 (NIR) 检测,这是一种快速而非破坏性方法。此外,这种方法也适合在生产过程中的质量控制。经常也要测定溶液的 pH。测定条件对于结果的一致性很重要。

5. 片剂

崩解和溶解时间对于泡腾产品是很重要的特性。好的

泡腾片处方会在 1~2min 内崩解、溶解,并形成透明溶液。因此,不溶性药物的残余必须尽可能少。水的温度影响溶解时间。选择合适的水温,也就是消费者实际使用时的水温,是非常重要的 (如冷自来水)。《欧洲药典》一般规定,泡腾产品在 15~25℃ 水中 5min 崩解^[1]。

硬度和脆碎度等因素将影响片剂在包装线上的包装,因为在包装过程中泡腾片的边缘容易破裂。当片剂装入管子中时,片子的厚度是十分重要的,因为包装的松紧很大一部分取决于片子的厚度。当药物的剂量很小或特别小时,监测含量均匀度十分重要。

6. 粉末和颗粒

粉末的质量差异与崩解和溶解时间一样,是很重要的特征。《欧洲药典》要求颗粒的崩解时限是 5min^[8]。

7. 生产区域

通常,包装同样数量的片剂,泡腾片所需处理原材料量比传统片剂要多。因为泡腾片的体积大,是普通片的许多倍。因此生产区域也很大,除非建立压缩的连续生产线。

在瑞典赫尔辛堡 Pharmacia 工厂,泡腾片生产的各个工序 (如混合、制粒、干燥、粉碎、颗粒和其他辅料的混合、压片和包装),都是在 RH 25% 以下、温度 25℃ 以下的除湿环境下进行的。其他公司的混合、制粒和干燥工序在正常湿度环境进行,但将最终混合物储存在除湿环境中,同时将去湿的空气通入混合物中。混合物然后在去湿的小区域中的压片机和包装机上进行压片和包装。

在直接压片过程中,混合可以在正常湿度下进行,但是在这种情况下,混合物必须在合适的容器中通入经流化床的空气来干燥 (为了避免提前发生泡腾反应)。压片和包装仍在除湿区域中进行,从而减少在低湿度区域中的生产步骤。

包装

泡腾片剂应储存在密闭容器或防潮的包装中^[6]。

如果不进行适当的保护,空气中的湿度也足以引起泡腾产品发生泡腾反应。当消费者打开包装,泡腾产品又将暴露在潮湿的空气中。因此,泡腾产品的包装十分重要。从片剂生产出来到开始包装的时间间隔应尽可能缩短。

《欧洲药典》建议泡腾制粒和粉末应该储存在密闭的容器中^[8]。过去,将酸性和碱性组分分别包装,从而避免泡腾粉末和颗粒在储存过程中发生泡腾反应。

1. 材料

泡腾产品通常包装于单个铝箔袋中,泡腾片常包装在金属管中。为了避免过度的碾压,包装袋的尺寸应该适应片剂的大小或泡腾颗粒的数量。这些袋子排列成适当大小的条带,堆放在厚纸板盒子中。

金属管是一种多功能容器,用防潮封口密封。片剂一



一个一个堆叠起来,这样,片剂周围的空气量最少。包装管是无缝合线的、挤出的铝制包装。通过与之匹配的含有干燥剂的塑料压盖密闭。塑料管,如聚氯乙烯或聚丙烯,也曾试验用于泡腾片包装。这些材料也能维持产品的稳定性。塑料管由于成本低、包装过程中噪声小而更为常用。

铝箔泡罩能够提供较好的密闭性,镀铝的薄膜或条带也可以有类似的保护作用。这里推荐一种特殊的泡腾片包装,每个片剂都能通过一个通道与干燥剂相通^[67]。

考察了环境湿度对泡腾片剂的物理稳定性的影响,该泡腾片包装在具有微观缺陷的铝塑包装中。在不同相对湿度和温度条件下储存,通过检测片剂成分是否发生反应来考察其物理稳定性。应用渗透性染料溶液试验检测铝箔包装是否有水分渗入。结果表明,在完整性较差的包装中,高湿度加速了泡腾片剂的物理变质^[68]。

2. 填充

如果产品需要保持长期稳定性,那么包装过程必须在低湿度环境中进行。片剂应该具有足够的硬度,而不至于在包装过程中破碎。

3. 质量控制

单个铝箔包装需要检测其密封性。有几种快速检测密封完整性的方法,如真空水下法、袋中的示踪物质检测法、可见气体净化法、红外密封检查法,以及电子气密检测法等^[3]。

结论

传统的泡腾产品是在口服前溶解的。这就要求药物必须具有较好的口感。当药物以溶液形式服用时,通常吸收较快,生物利用度较好。

泡腾产品的产业化生产必须控制生产区域的空气湿度。一般需要特殊的片剂生产设备,包装也是泡腾产品很重要的一部分。OTC 止痛药已有泡腾产品成功上市。

参考文献

- European Pharmacopoeia, 3rd Ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 1999; 1347, Suppl. 2000.
- Chilson, F. Effervescent Tablets. *Drug Cosm. Ind.* 1936, 39, 738—740.
- Mohrle, R. Effervescent Tablets. *Pharmaceutical Dosage Forms*, 2nd Ed.; Lieberman, H. A., Lachman, L., Schwartz, J. B., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1989; 1, 285—328.
- Sendall, F. E. J.; Staniforth, J. N.; Rees, J. E.; Leatham, M. J. Effervescent Tablets. *Pharm. J.* 1983, 230, 289—294.
- Schmidt, P. C.; Christin, I. Brausetabletten—Eine Fast Vergessene Arzneiform. *Pharmazie* 1990, 45, 89—101.
- The United States Pharmacopeia USP 24, United States Pharmacopeial Convention; Rockville, MD, 1999, 2117.
- The United States Pharmacopeia USP 24; United States Pharmacopeial Convention; Rockville, MD, 1999; 18, 167, 1354, 1355, 1356, 1360.
- European Pharmacopoeia, 3rd Ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 1996; 1749, 1752.
- Higuchi, T.; Perrin, J.; Robinson, J.; Repta, A. J. Carbonation of Aqueous Solutions with Acid Anhydrides. *J. Pharm. Sci.* 1965, 54, 1273—1276.
- Nyström, C.; Karehill, P.-G. The Importance of Inter-molecular Bonding Forces and the Concept of Bonding Surface Area. *Pharmaceutical Powder Compaction Technology*; Alderborn, G., Nyström, C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1996; 17—53.
- Wade, A., Weller, P. J., Eds. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd Ed.; The American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Society of Great Britain; Washington and London, 1994; 123—125.
- Kommentar, Böhme, H., Hartke, K., Eds.; *Acidum citricum. Europäisches Arzneibuch*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; Stuttgart, and Govi-Verlag GmbH; Frankfurt, 1979; III, 215—219.
- Duberg, M.; Nyström, C. Studies on Direct Compression of Tablets. XVII. Porosity—Pressure Curves for the Characterization of Volume Reduction Mechanisms in Powder Compression. *Powder Technol.* 1986, 46, 67—75.
- Duberg, M.; Diabact, A. B. Personal Communications. Box 303, S-751 05, Uppsala, Sweden.
- Wade, A., Weller, P. J., Eds.; *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd Ed.; The American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Society of Great Britain; Washington and London, 1994; 522—523.
- Schmidt, P. C.; Brögmann, B. Brausetabletten. Welche Säurekomponenten Sind Die Geeignesten. *Dtsch. Apoth.-Ztg.* 1987, 127, 991—997.
- Wade, A., Weller, P. J., Eds.; *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd Ed.; The American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Society of Great Britain; Washington and London, 1994; 15—18.
- Nyström, C.; Glazer, M. Studies on Direct Compression of Tablets. XIII. The Effect of Some Dry Binders on the Tablet Strength of Compounds with Different Fragmentation Propensity. *Int. J. Pharm.* 1985, 23, 255—263.
- Schmidt, P. C.; Brögmann, B. Effervescent Tablets; Choice of a New Binder for Ascorbic Acid. *Acta Pharm. Technol.* 1988, 34, 22—26.
- Wade, A., Weller, P. J., Eds.; *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd Ed.; The American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Society of Great Britain; Washington and London, 1994; 15—18.

- sociation and the Pharmaceutical Society of Great Britain: Washington and London, 1994; 197—198.
21. Rothe W.; Groppenbacher G.; Heinemann H. Brausetabletten, Brausepulver und Verfahren zur Herstellung Derselben. German Patent Application No. 1, 962, 791
22. Wade, A., Weller, P. J., Eds. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Ed.; The American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Society of Great Britain: Washington and London, 1994; 436—438.
23. Neumüller, O. A. Römpps Chemie-Lexikon, 7th Ed.; Franckh'sche Verlagshandlung: Stuttgart, 1974; 2277.
24. Saleh, S. I.; Boymond, C.; Stamm, A. Preparation of Direct Compressible Effervescent Components; Spray-Dried Sodium Bicarbonate. *Int. J. Pharm.* 1988, 45, 19—26.
25. Parfitt, K., Ed. Martindale: The Complete Drug Reference, 32nd Ed.; The Pharmaceutical Press: London, 1999; 1630.
26. Neumüller, O. A. Römpps Chemie-Lexikon, 7th Ed.; Franckh'sche Verlagshandlung: Stuttgart, 1974; 1697.
27. Wells, M. L.; Wood, D. L.; Sanftleben, R.; Shaw, K.; Hottovy, J.; Weber, T.; Geoffroy, J.-M.; Alkire, T. G.; Emptage, M. R.; Sarabia, R. Potassium Carbonate as a Desiccant in Effervescent Tablets. *Int. J. Pharm.* 1997, 152, 227—235.
28. Wade, A., Weller, P. J., Eds.; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Ed.; The American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Society of Great Britain: Washington and London, 1994; 52—55.
29. Ejifor, O.; Esezobo, S.; Pilpel, N. The Plasto-Elasticity and Compressibility of Coated Powders and the Tensile Strengths of their Tablets. *J. Pharm. Pharmacol.* 1986, 38, 1—7.
30. Roberts, R. J.; Rowe, R. C. The Effect of Punch Velocity on the Compaction of a Variety of Materials. *J. Pharm. Pharmacol.* 1985, 37, 377—384.
31. Fiedler, H. P. Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und Angrenzende Gebiete, 2nd Ed.; Editio Cantor: Aulendorf, Germany, 1981; 647.
32. Banker, G. S.; Anderson, N. R. Tablets: The Theory and Practice of Industrial Pharmacy, 3rd Ed.; Lachman, L., Lieberman, H. A., Kanig, J. L., Eds.; Lea & Febiger: Philadelphia, 1986; 293—345.
33. Hakata, T.; Ijima, M.; Kimura, S.; Sato, H.; Watanabe, Y.; Matsumoto, M. Effects of Bases and Additives on Release of Carbon Dioxide from Effervescent Suppositories. *Chem. Pharm. Bull.* 1993, 41, 351—356.
34. Kurobe, T.; Kasai, M.; Kayano M. Stable Effervescent Vaginal Suppositories, US Patent 4, 853, 211.
35. Krögel, I.; Bodmeier, R. Floating or Pulsatile Drug Delivery Systems Based on Coated Effervescent Cores. *Int. J. Pharm.* 1999, 187, 175—184.
36. Ekenved, G.; Elofsson, R.; Sölvell, L. Bioavailability Studies on a Buffered Acetylsalicylic Acid Preparation. *Acta Pharm. Suec.* 1975, 12, 323—332.
37. Orton, K.; Treharne; Jones, R.; Kaspi, T.; Richardson, R. Plasma Salicylate Levels after Soluble and Effervescent Aspirin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1979, 7, 410—412.
38. Hedges, A.; Clive, M. K.; Maclay, W. P.; Turner, P. A Comparison of the Absorption of Effervescent Preparations of Paracetamol and Penicillin V (Phenoxymethylpenicillin) with Solid Dosage Forms of these Drugs. *J. Clin. Pharmacol.* 1974, 14, 363—368.
39. Helliwell, M.; Berry, D. Theophylline Absorption by Effervescent Activated Charcoal (Medicoal®). *J. Int. Med. Res.* 1981, 9, 222—225.
40. Gibaldi, M. Biopharmaceutics. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy, 2nd Ed.; Lachman, L., Lieberman, H. A., Kanig, J. L. Eds.; Lea & Febiger: Philadelphia, 1976; 78—140.
41. Eichman, J. D.; Robinson, J. R. Mechanistic Studies on Effervescent-Induced Permeability Enhancement. *Pharm Res.* 1998, 15, 925—930.
42. Altomare, E.; Wendemiale, G.; Benvenuti, C.; Andreatta, P. Bioavailability of a New Effervescent Tablet of Ibuprofen in Healthy Volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1997, 52, 505—506.
43. Murray, R. B. New Approach to the Fusion Method for Preparing Granular Effervescent Products. *J. Pharm. Sci.* 1968, 57, 1776—1779.
44. Gunsel, W. C.; Kanig, J. L. Tablets. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy, 2nd Ed.; Lachman, L., Lieberman, H. A., Kanig, J. L. Eds.; Lea & Febiger: Philadelphia, 1976; 321—358.
45. Joachim, J.; Kalantzis, G.; Jacob, M.; Mention, J.; Maury, L.; Rambaud, J. Technologie d'un Granule Effervescent. *Etudes Physico-Chimiques. J. Pharm. Belg.* 1986, 41, 197—208.
46. Devay, A.; Uderszky, J.; Racz, I. Optimization of Operational Parameters in Fluidized Bed Granulation of Effervescent Pharmaceutical Preparations. *Acta Pharm. Technol.* 1984, 30, 239—242.
47. Lindberg, N.-O. Preparation of Effervescent Tablets Containing Nicotinic Acid and Sodium Bicarbonate. *Acta Pharm. Suec.* 1970, 7, 23—28.
48. Saleh, S. I.; Aboutaleb, A.; Kassem, A. A.; Stamm, A. A Contribution to the Formulation of Effervescent



- Tablets by Direct Compression. *Labo-Pharma Probl. Tech.* 1984, 32, 763—766.
49. Röscheisen, G.; Schmidt, P.C. The Combination of Factorial Design and Simplex Method in the Optimization of Lubricants for Effervescent Tablets. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1995, 41, 302—308.
 50. Rotthäuser, B.; Kraus, G.; Schmidt, P.C. Optimization of an Effervescent Tablet Formulation Containing Spray Dried L-leucine and Polyethylene Glycol 6000 as Lubricants Using a Central Composite Design. *Sur. J. Pharm. Sci.* 1998, 46, 85—94.
 51. Lindberg, N.-O.; Tufvesson, C.; Olbjer, L. Extrusion of an Effervescent Granulation with a Twin Screw Extruder, Baker Perkins MPF 50 D. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1987, 13, 1891—1913.
 52. SWEDIS, Medical Products Agency, Box 26, S-751 03. Uppsala, Sweden.
 53. El-Banna, H. M.; Minina, S. A. The Construction and Uses of Factorial Designs in the Preparation of Solid Dosage Forms. Part 1: Effervescent Acetylosalicylic Acid Tablets. *Pharmazie* 1981, 36, 417—420.
 54. Anderson, N. R.; Banker, G. S.; Peck, G. E. Quantitative Evaluation of Pharmaceutical Effervescent Systems II: Stability Monitoring by Reactivity and Porosity Measurements. *J. Pharm. Sci.* 1982, 71, 7—13.
 55. Desai, S. R.; Allen, L. V.; Greenwood, R. B.; Stiles, M. L.; Parker, D. Effervescent Solid Dispersions of Prednisone, Griseofulvin and Primidone. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1989, 15, 671—689.
 56. Usui, F.; Carstensen, J. T. Interactions in the Solid State I: Interactions of Sodium Bicarbonate and Tartaric Acid under Compressed Conditions. *J. Pharm. Sci.* 1985, 74, 1293—1297.
 57. White, B. Stable Effervescent Compositions and Method of Preparing Same. US Patent 3, 105, 792.
 58. Bulut, P.; Özer, A. Y.; Sumnu, M.; Hincal, A. A. Evaluation of the Stability of Commercial Effervescent and Dispersible Aspirin Tablets by Factorial Analysis. *S. T. P. Pharm. Sci.* 1991, 1, 357—361.
 59. Silver, B.; Sundholm, G. Solid-State Esterification of Codeine Phosphate by the Acid Constituent of Effervescent Tablets. *J. Pharm. Sci.* 1987, 76, 53—55.
 60. Narurkar, A. N.; Purkaystha, A. R.; Sheen, P.-C. Effect of Various Factors on the Corrosion and Rusting of Tooling Material Used for Tablet Manufacturing. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1985, 11, 1487—1495.
 61. Siegel, S.; Hanus, E. J.; Carr, J. W. Polytetrafluorethylene Tipped Tablet Punches. *J. Pharm. Sci.* 1963, 52, 604—605.
 62. Stammberger, W. Entwicklung von Brausezubereitungen. *Acta Pharm. Technol.* 1975, 21, 177—184.
 63. Sendall, F. E. J.; Staniforth, J. N. A Study of Powder Adhesion to Metal Surfaces During Compression of Effervescent Pharmaceutical Tablets. *J. Pharm. Pharmacol.* 1986, 38, 489—493.
 64. Amela, J.; Salazar, R.; Cemeli, J. Methods for the Determination of the Carbon Dioxide Evolved from Effervescent Systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1993, 19, 1019—1036.
 65. Anderson, N. R.; Banker, G. S.; Peck, G. E. Quantitative Evaluation of Pharmaceutical Effervescent Systems I: Design of Testing Apparatus. *J. Pharm. Sci.* 1982, 71, 3—6.
 66. Spitz, H. D. Determination of Water in Aluminum Chlorohydrate and Effervescent Tablets by Karl Fischer analysis. *J. Pharm. Sci.* 1979, 68, 122—123.
 67. Ritschel, W. A. Die Tablette. Grundlagen und Praxis Des Tablettierens, Granulierens und Dragierens; Editio Cantor KG; Aulendorf Germany, 1966; 116.
 68. David, S. T.; Gallian, C. E. The Effect of Environmental Moisture and Temperature on the Physical Stability of Effervescent Tablets in Foil Laminate Package Containing Minute Imperfections. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1986, 12, 2541—2550.

进一步阅读

- Mohrle, R. Effervescent Tablets. *Pharmaceutical Dosage Forms*, 2nd Ed.; Lieberman, H.-A., Lachman, L., Schwartz, J. B. Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1989; 1.
- Schmidt, P. C.; Christin, I. Brausetabletten—eine fast vergessene Arzneiform. *Pharmazie* 1990, 45, 89—101.
- Sendall, F. -E. -J.; Staniforth, J. -N.; Rees, J. -E.; Leatham, M. J. Effervescent Tablets. *Pharm. J.* 1983, 230, 289—294.

(卢文芸 译)

P

片剂处方

Larry L. Augsburger

University of Maryland, Baltimore, Maryland, U. S. A.

Mark J. Zellhofer

University Pharmaceuticals of Maryland, Inc., Baltimore, Maryland, U. S. A.

片剂处方的目的简介

如果没有合适的输送系统,即使是世界上最新的治疗药物,也没有一点价值。压成片的药物输送系统范围很广,从相对简单的速释制剂到复杂的缓控释制剂。药物输送系统最重要的职能就是将药物以合适的速度足量输送到靶部位,但是它必须同时满足许多其他基本标准。这包括物理和化学稳定性,能够经济地大规模生产,并能保证每批产品每个制剂单位中剂量均等,以及尽可能提高患者依从性(例如,合理的大小和形状、口感、颜色等等,能鼓励患者按照处方的给药方案服药)。

虽然新的治疗实体的发现总会令人兴奋,但制剂专家的贡献往往没有被人很好地理解,或被认为是理所当然的,而未加称赞。然而,药物和它的输送系统是不能分开的。片剂的设计总则如下:

(1) 最佳的药物溶出度,药物能按照设计目标(如速释或缓释)从制剂中溶出而被吸收。

(2) 药物含量准确均一。

(3) 稳定性,包括原料药和片剂处方整体的稳定性、崩解及在一段时间内药物从片剂中溶出的速度和程度的稳定性。

(4) 患者依从性。成品应尽可能具有吸引人的外观,包括颜色、大小、口感等,在可行范围内,最大程度地提高患者依从性,从而鼓励患者按照处方用药方案服药。

(5) 可生产性。处方设计应该考虑高效、低成本、实用地生产所需产品。

片剂能够设计成符合这些标准正是片剂成为最普遍的口服固体制剂的原因。虽然不同类型的片剂会有差异,但它们大多数是压制生产的,从而能整个吞服,迅速释药。本文介绍速释压制片的设计和配方的系统方法。

现代片剂处方设计和生产

片剂必须满足一个独特的设计平衡。主成分颗粒所需的快速或可控的崩解和溶出性质必须和可生产性及固体压制物的外观及机械耐磨性达到平衡。

辅料对于给药系统的设计至关重要,它决定了给药系统的质量和性能^[1]。它们能用于提高稳定性(抗氧化剂,紫外线吸收剂),优化或修饰药物释放(崩解剂、亲水性聚

合物、润湿剂、生物可降解聚合物),提供基本的生产工艺性能(黏合剂、助流剂、润滑剂),提高患者依从性(矫味剂)或有助于产品识别(着色剂)。因此片剂处方不是成分的随意组合,而是经过谨慎考虑得出的,合理的处方能满足上述的要求。

制剂学家有许多辅料可以选择,但是某些外部因素如成本、功能可靠性、可获得性和国际认可性等,支配着他们的选择。例如,虽然官方药典提供辅料的鉴别和纯度标准,但专论中却不提供确保它们功能性的试验。例如,国家处方集中可压性糖的专论中没有提供可压性的试验。《美国药典》中乳糖专论没有提及符合专论标准的粒径和压片规格。国家处方集中预胶化淀粉专论提到了具有可压性和易流动性的规格,但没有提供针对这些性质的标准或试验。崩解剂和润滑剂专论中也没有和它们的性能相关的试验。与控制鉴别和纯度一样,提供功能性试验或与功能性明显的试验的需要也很重要^[2]。近年来随着多种来源的现代辅料的出现,例如用于直接压片的填充剂和黏合剂,以及各种类别的“超级”崩解剂,这种需要愈加明显。

跨国公司和其他一些占据国际市场的公司目前面临的一个主要问题就是辅料缺少在不同国家的普遍接受性。对国际市场来说,辅料的选择经常是在功能性、地区限制、费用以及在生产国的可获得性之间折中选择。近年来,制药工业的全球化促进了协调药典辅料标准、辅料生产的质量管理规范(GMP)和用于消除或避免不同国家间贸易壁垒的新辅料的安全性评价指南^[3]的建立。国际药用辅料协会(IPEC)于1991年成立,由生产商、使用者和制剂学家组成,用于帮助美国、日本和欧洲各地区管理当局相互协调。后来成立IPEC-美国、IPEC-欧洲、IPEC-日本(JPEC)这三个独立的组织,它们被称作TriPEC,在1993年已包含了100多家辅料和制药公司^[3]。

处方前研究

处方前研究的目的是获取一组原料药信息并以此作为一套参数,依据这些参数进行详细的处方设计。处方前研究用于鉴别药物和辅料的物理化学性质,这些性质能影响处方设计、生产方式和最终产品的药动学-生物药剂学性质。

下面就是针对片剂的通用的处方前研究方案。对于某些试验,假定药物本身有多种来源(以前全新的化学实体



的专利已过期，并且在仿制药市场都能够买到），《美国药典》有专论收载。

1. 鉴别和纯度

任何药物的研究必须从它的鉴别和纯度试验开始。这些试验对于鉴别降解物和污染物是必须的，包括颜色、气味、味道等感官试验。《美国药典》中几乎所有的市售化合物都有纯度试验。替代方法只有依据美国药典方法进行了验证后，才能使用。除了效价试验，其他能帮助鉴别或测定化合物纯度的试验是熔点、旋光度、pH、重金属、炽灼残渣等。杂质有时能影响稳定性，金属污染能催化化学反应。杂质还能改变药物的颜色。杂质指数（II）和同质性指数（HI）等技术可用于杂质定量评价。在《美国药典》中比较普遍的是用薄层色谱（TLC）检测杂质。

2. 晶体性质和多晶型性

许多药物不只具有一种形态，形态是由结晶步骤的条件决定的。有时候，药物在分子没有以固定模式排列时沉淀，将会形成无定形粉末。也有可能药物按一定比例包裹住溶剂形成溶剂化物。

即使它们化学组成相同，但化合物的不同晶型具有不同的自由能，因此具有不同的物理性质，从而很大程度上影响产品性能^[4]。这些性能包括溶解度和溶出速率（影响生物利用度）、固态稳定性（影响药效）、变形特征（影响可压性）、粒径和形状（影响粉末密度和流动性）的差异。具有最低自由能的形态比其他形态稳定。虽然其他形态从自由能的角度考虑是不利的，但如果它们保持干燥，则会一直能保持某种形态，这称为“亚稳态”。亚稳态的物质可能更好，尤其是它能更快溶出。

在制剂生产中，如减小粒径、湿法制粒、干燥、甚至压片过程中，会发生多晶型转化^[5]。用于测定晶体性质的试验有差示量热分析（DTA）、差示扫描量热法（DSC）和X射线衍射^[4]。细节可参阅本书D. Giron撰写的“药物和药品的热分析”一章。

3. 粒子大小、形态和表面积

原料药的性质决定它在处方中的性能时，颗粒性质可能比其他性质都重要。当药物是难溶性的非电解质或在pH很低时难溶的游离酸，这一点尤为明显。这些药物可能是溶出速率限制吸收的，如果溶出不够快，它在体液中可能一直达不到治疗浓度，血药浓度达峰时间会延后很久，或者大部分剂量药物到不了胃肠道中吸收最好的地方。减小粒径（如微粉化）是提高溶出速率的常用方法。与大粒子相比，小粒子单位质量有更大的表面积与溶出介质接触，所以溶出更快。决定药物溶出速率及决定生物利用度的性质中，粒径和表面积是两个最重要的性质。不合适的药物粒径导致了許多生物利用度问题和生物不等效的例子。

粒子的大小和形状对于混合器中粉末是否混合均匀有着特别重要的作用。操作过程或压制过程中的粒子的分离

会在很大程度上影响成品的含量均一性。粒径也能影响药物的稳定性，因为粒径决定了可以发生氧化和水解的表面积。在片剂中，表面积对于药物和辅料的相互作用也是至关重要的，因此也能影响稳定性。测定粒径和形状的方法有光学显微镜、电子扫描显微镜、筛析、各种电子传感区粒子计数器。测定表面积的方法有空气透气性和各种气体吸附技术。

4. 粉体性质

在制药过程中粉体性质特别重要^[6]。了解药物和辅料的真密度和堆密度非常有用，表现在以下方面：

（1）能预测最终片剂的大小和生产过程中所需设备的大小和类型。

（2）能预见粉末物理混合过程中产生的问题，以及中间产物和最终产品的均匀性，因为真密度的显著差异会引起粒子分层。

（3）预测由密度引起的流动性问题。

（4）鉴别不同批次或不同供应商的原材料的差别，因为不同的粒子形态能形成不同的真密度。

颗粒真密度、颗粒表观密度和堆密度的比较能为总孔隙率、颗粒间孔隙率和颗粒内部孔隙率提供信息。方法包括采用氦密度法、水银渗透孔隙法以及灌注振实堆密度法来测量真实颗粒密度。

吸潮对于粉末的化学稳定性、流动性、可压性以及制粒有影响。辅料的水分含量和吸湿性尤其重要，因为它会影响整个产品的生产工艺及成品的稳定性。吸湿性、湿度-吸湿等温线和平衡水分含量能够通过热重分析和Karl Fisher滴定法测定。

相对大剂量药物和处方的可压性是另一个重要性质。可压性对于小剂量药物较少考虑，因为直接压片填充剂可以弥补药物的机械可压性差的缺点。仪表化的压片机^[7]或者压片模拟器^[8]能用于评价压制物的机械强度和用于形成片子的压力的关系。这种关系是所有确定并提供某种材料的可压性的压力测定中最简单的。压制物机械强度的测定包括硬度（或压碎力）、抗张强度和脆碎度。其他更复杂的研究，更简单、可能做得最好的是采用压片模拟器，包括测定压片的功或能量、压力-密度（Athy-Heckel）分析、应变速率敏感性和弹性回复^[9]。Athy-Heckel分析为形变机理提供信息，可预测材料的平均屈服压^[10]。不同压片速度下测得的屈服压的比较能为材料的应变速率敏感性提供信息^[11]。如果处方的主要成分（包括药物）是应变率敏感的，用高速压片机生产的片子会叠片或顶裂。过多的弹性回复也能产生这种现象。Hiestand指数（黏合和脆裂）可用于在实验室条件下评价材料的可压性^[12]。

下面的试验方法可用于评价流动性：

- 休止角；
- 最小孔径；
- 卡尔指数；
- 流速；

- 压片过程中直接观察片重差异。

流动性检验的最终目的是确定粉末或粉末混合物能够使成品片剂片重差异最小。粉末流动性越好，它填充压片机冲模圈的效率越高，重现性越好，体现在片重增加，片间质量差异减小^[13]。

5. 溶解性和渗透性

在很多情况下，药物在胃肠液中的溶出速率是吸收的限速步骤。FDA 制定的生物等效性规定把低溶解度定义为“水中的溶解度小于 5mg/mL，30min 内溶出速率低于 50%”^[14]。但是，药物的溶解度和剂量应同时考虑；也就是说，如果一个药物溶解度很低，但有效治疗剂量很小，它在生理条件下有可能完全溶解。因此，Amidon 等^[15]把“高溶解度”药物定义为在 37℃ 生理 pH 范围（1~8）内，最大用药剂量能溶解于 250mL（或更少）水中的药物。“低溶解度”药物是在生理 pH 范围内最大治疗剂量需要多于 250mL 水溶解的药物。生物利用度问题需要同时考虑剂量和药物的溶解体积和它的渗透性。Amidon 等^[15]根据这两个参数评价，建立了生物药剂学药物分类系统（BCS）：

- 第一类：高溶解度和高渗透性；
- 第二类：低溶解度和高渗透性；
- 第三类：高溶解度和低渗透性；
- 第四类：低溶解度和低渗透性。

用插管法测得人空肠渗透性至少为 $2 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^{-4}$ cm/s 的药物，可认为是“高渗透性”。对于很多物质，这个渗透性对应 90% 或更多的吸收分数。这种分类系统为生物利用度问题的预测提供了合理的基础。例如，第一类药物（如盐酸普萘洛尔、酒石酸美多洛尔）预测很少会出现生物利用度问题。另一方面，第二类药物（如吡罗昔康）较有可能会出现溶出速率限制的吸收问题。第三类药物（如阿替洛尔）较可能是吸收（渗透）速率限制吸收。第四类药物（低溶解度—低渗透性）生物利用度有很大障碍。体外—体内相关性（IVIVC）只在第二类药物中可能出现。如果第一类药物的溶解速率比胃排空速率慢，则也可能出现体内外相关。如果第一类药物溶解很快，体内外相关性很差或几乎没有，因为胃排空（不是溶出）是限速步骤。第三或第四类药物体内外相关性很差或没有。

FDA 采用 BCS 制定了指南，对于速释口服固体制剂的放大和批准后更改（SUPAC-IR）的政策更加宽松了。对于某种改动，随着药物类别的不同而要求不同，对第一类药物的要求最宽松，第二类和第三类药物其次，第四类药物最严格。这个政策在 1994 年 11 月 29 日第一次作为草案提出征求意见^[16,17]，1995 年 11 月 30 日在《联邦注册》上发布了修订版。

在处方前试验中经常用转盘法或 Wood 氏仪器测定药物的特性溶出速率（IDR）^[18]。根据标准溶出仪改装的自动 IDR 系统，能在搅拌器上附加冲模，在模圈纯药物被压成片，片子一面朝向冲模底部^[19]。IDR 能用于检测不同晶型，判断药物溶出速率限制吸收的可能性。Kaplan^[20]提出，

IDR 高于 1mg/(cm²·min)，表明药物不太可能出现溶出相关的吸收问题，IDR 低于 0.1mg/(cm²·min)，表明药物溶出速率限制吸收。

6. 药物-辅料相容性研究

了解药物和辅料的相互作用，是一开始摸索处方的关键。在后来放大生产中产生问题时，对于判断是否因药物和辅料互不相容影响生产或稳定性，了解药物和辅料的相互作用是必要的。药物-辅料相互作用经常和其他成分中的水分直接相关，或与制剂在生产或储存条件下的湿度有关。这些试验经常在高温高湿条件下进行，尽管必须承认一些相互作用是物理的（熔化和挥发）而非化学的，加速老化并不能预测。将药物和辅料按照最终剂型中的比例混合形成混合物，研究辅料-药物相互作用的试验经常用这些混合物来进行。例如，填充剂黏合剂与药物的比例高于润滑剂和崩解剂与药物的比例。这些研究常常借助于方差或析因一方差试验设计^[21]。粉末是物理混合的，制粒或压制可能会加速任何可能的相互作用。样品可以放置在敞口盘子或密封于小瓶或安瓿中以模仿产品包装。样品的评价包括：

- 目测颜色或结构的变化。
- 以未暴露在加速条件下的样品做对照，用 HPLC 和 TLC 分析。通常开始时，只有定性的结果重要。
- 应用差示量热分析方法，观察一个或多个峰的出现或消失。等温微量热法和热活动监测技术（TAM）也可用于分析。

在检测原材料和成品制剂的性质时，相容性研究是非常重要的。有人说药物-辅料二元筛选研究效率低，不现实，忽视了工艺变量。更好的方法是根据已知的化学知识和已公开的相容性数据，仔细地筛选潜在的辅料，进行微型处方稳定性研究^[22]。

7. 处方设计

根据处方前研究的结果，能够进行处方设计，确定工艺过程。开始时，以参考剂量为指导。相对低剂量的药物通过直接压片生产，直接压片是指将原料药和辅料混匀后压片，不需要湿法或干法制粒，但有时会将药物溶液喷在辅料上，保证低剂量药物混合均匀。可压性差的大剂量药物可制粒后压片。药物的其他性质也决定了工艺步骤和辅料的选择。

8. 关键变量的分析和处方开发

在处方前研究的基础上，可以选择一些辅料，制备小批量产品。批次的数量和大小取决于原料药是否容易获得。这些批次是为了评价处方的可行性，包括辅料的种类和规格，以及工艺和操作变量，如加料顺序、混合时间、压力、制粒时间等等。目的就是研制出符合一定标准的处方和工艺，这些标准是为最终目标预先制订的。

生产

传统的片剂是通过制粒工艺生产的,该工艺能赋予处方两个必需的性质:可压性和流动性。湿法制粒和干法制粒(预压或干压)都可行(表1)。无论是直接压片还是制粒,片剂生产的第一步研磨和混合相同;接下去的步骤就不同了。

表1 湿法制粒、干法制粒和直接压片的典型单元操作

湿法制粒	干法制粒	直接压片
药物和辅料的研磨和混合	药物和辅料的研磨和混合	药物和辅料的研磨和混合
配制黏合剂溶液	压制成预压片或干片	压片
加入黏合剂溶液或制粒溶剂制软材	压片或干片的研磨和过筛	
软材过筛	润滑剂和崩解剂的混合	
湿颗粒干燥	压片	
干颗粒整粒与润滑剂和崩解剂混合制得压片粉末		
压片		

粉末制得的软材先用高剪切搅拌机搅拌后,再过筛。湿制颗粒通常用流化床烘干,可提高工艺效率。或者,可以在流化床干燥制粒机中进行湿法制粒,液相被喷洒到流化状态的粉末上,同时用热气流将颗粒干燥。这个过程能自动化控制,简化了处理步骤,节约了制粒的时间和空间。湿法制粒的优点和缺点见表2。参阅 H. G. Kristensen 和 T. Schaeffer 的“制粒”一章 [Encyclopedia of Pharmaceutical Technology (First Edition), Vol. 7]。

表2 湿法制粒的优点和缺点

优点	缺点
提高流动性和可压性,适用于流动性和(或)可压性差的高剂量药物	每个单元操作均较复杂
减少空气滞留	多个单元操作增加了出现问题的概率
减少粉尘	难以控制和验证
引入了一种液体(湿法制粒),可将低剂量的药物分散在溶液中,保证含量均匀性	干燥的温度、时间和速率对烘干过程中药物稳定性和分布可能有不良影响
通过亲水化(湿法制粒)提高了粉末的润湿性	从空间、时间和设备上,总体比直接压片成本高
允许对粉末进行处理,而降低混合质量	

不管制粒的方法如何,直接压片工艺相对简单,有以下优点:

- (1) 经济;
- (2) 避免了加热和水分;
- (3) 片剂崩解好;
- (4) 稳定。

直接压片最大的优点就是经济性,由于减少了工艺时间,节省了设备和空间,减少了工艺验证,降低了能耗。通常,直接压片除了将药物微粉化外,只需混合和压片两个步骤。不同于湿法制粒,直接压片过程不需要加热和水,它们会影响药物稳定性。而且,直接压片避免了干法制粒中预压和滚动挤压过程中的高压。此外,直接压片对于崩解也是最佳的,因为直接压片的片子崩解时直接形成原始粒子,而不用像颗粒那样,再次分解形成原始粒子。最后,直接压片的片剂很少出现长期储存后化学稳定性问题或溶出的变化。

虽然直接压片与制粒后压片相比有许多明显的优点,它也有如下不足之处:

- (1) 混合均匀的问题,防止低剂量药物混合不均匀。
- (2) 所用的填充剂比制粒压片中的贵。
- (3) 对物理性质和功能性要求更高;原材料的性质必须详细规定,严格控制。
- (4) 生产彩色的片子受到限制。
- (5) 粉尘问题。
- (6) 限制了填充剂-黏合剂的稀释性能。
- (7) 对于润滑剂的软化效应和混合过度,比制粒压片更敏感。

辅料的稀释性能的限制,使得可压性差的大剂量药物无法直接压片。润滑剂的用量是在足够的润滑效果和对可压性的副作用之间取得一个平衡。直接压片要更多地考虑药物含量的均匀性,尤其是低剂量药物。因为药物不是被“锁在”颗粒里的,在后续操作中,混合物容易产生分层。另外,为了提高溶出速率,药物通常在混合前微粉化、它产生的很高比表面积会使表面相互作用,导致流动和混合困难。另一个比较大的局限性就是,不像湿法制粒,直接压片很大程度上依靠辅料(和药物)的重现性。因此一定要严格规定原材料的标准和功能性,避免药物和辅料的批间差异。直接压片中,原材料费用和对它们检测的费用比较高。

因此,直接压片需要注意辅料的选择、合适的流动性、混合的均匀性以及处方间的相互影响和能影响可压性和药物溶出的工艺变量。细节参阅本书原著第一版中 R. F. Shangraw 的“直接压片”一章。

辅料

处方设计和辅料筛选对片剂尤为重要。片剂产品变化很大,可以从相对简单的阿司匹林片(含有阿司匹林和淀粉),到更复杂的可能含有填充剂、黏合剂、崩解剂、助流

剂、润滑剂和包衣剂的系统。控释制剂的处方更加复杂。很显然，辅料和它们用量的恰当选择决定了生产片剂的能力

以及它们作为药物输送系统的性能。有人已很详细地说明了各种辅料的规格，参考文献见表3。

表3 辅料文献

辅料类别	参考文献 (本书原著第一版)
总类	Rudnic, E.; Kottke, M. Tablet Dosage Forms. In: Modern Pharmaceutics, 3rd Ed.; Banker, G., Rhodes, C. (Eds.); Marcel Dekker, Inc.; New York, 1996; 333.
稀释剂和填充剂	Czeisler, J.; Perlman, K. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Swarbrick, J., Boylan, J., (Eds.); Marcel Dekker, Inc.; New York, 1991; Vol. 4, 37.
黏合剂	Kristensen, H. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Swarbrick, J., Boylan, J., (Eds.); Marcel Dekker, Inc.; New York, 1988; Vol. 1, 415.
崩解剂	Shangraw, R.; Mitrevej, A.; Shah, M. Pharm. Tech. 1980; 4 (10), 49. Augsburger, L. L.; Brzezko, A. W.; Shah, U.; Hahm, H. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Swarbrick, J., Boylan, J., (Eds.); Marcel Dekker, Inc.; New York, 2001; Vol. 20, Suppl. 3.
润滑剂和助流剂	Zanowiak, P. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Swarbrick, J., Boylan, J., (Eds.); Marcel Dekker, Inc.; New York, 1994; Vol. 9, 87.
成膜剂	Radebaugh, G. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Swarbrick, J., Boylan, J., (Eds.); Marcel Dekker, Inc.; New York, 1993; Vol. 6, 1.
控释剂	Chien, Y. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Swarbrick, J., Boylan, J., (Eds.); Marcel Dekker, Inc.; New York, 1990; Vol. 3, 281.
着色剂	Woznicki, E.; Schoneker, D. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Swarbrick, J., Boylan, J., (Eds.); Marcel Dekker, Inc.; New York, 1990; Vol. 3, 65.
矫味剂	Adjei, A., et al. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Swarbrick, J., Boylan, J., (Eds.); Marcel Dekker, Inc.; New York, 1993, Vol. 6, 101.

(1) 可生产性

辅料起着提供可压性、润滑性、流动性、崩解性和润湿性等作用。没有选好辅料会导致一些性能(硬度、外观)差,这对包装、储存和患者依从性会产生很重要的影响。辅料问题可能源自来源或批间差异,尤其是直接压片处方。辅料问题的例子有:Hoc纤维素和微晶纤维素,由于粒径、流动性、可压性引起性能差异;山梨醇由于不同的晶型(α 、 β 和 γ)造成片剂硬化。乳糖粒径和修饰(喷雾干燥或无水)的不同会引起表面积不同,从而造成润滑剂分布不同。无水乳糖粒径越大,形成水化物所需的湿度越大。

(2) 生物药剂学

片剂的处方能影响它的生物利用度。低剂量的难溶性药物要格外注意,尤其是微粉化的。难溶性药物不能单独与不溶性填充剂制成处方,这些填充剂包括钙盐(硫酸钙、磷酸钙),它们只在很低的pH下溶解。钙盐水合物和无水物之间溶解速率的差异以及二价盐和三价盐之间溶解速率的差异都很重要。有些情况下,辅料会和药物形成复合物,如钙盐和四环素。改变片剂中易溶和不溶性填充剂的比例能极大地改变难溶性药物(弱酸和非电解质)的溶出方式,但是对能溶于胃液的弱碱没有作用。

崩解剂的种类和用量也很重要。来源不同(玉米、土豆、大米)以及支链淀粉和直链淀粉比例的不同能导致崩解时间不同。颗粒中的淀粉没有颗粒间的淀粉崩解作用强,但颗粒间的淀粉溶出差。无论是直接压片还是湿法制粒处方,加入超级崩解剂(交联聚维酮、交联羧甲基纤维素钠、羧甲基淀粉钠)都能提高它们的溶出。交联羧甲基纤维素钠和羧甲基淀粉钠在水中都能和少量的阳离子药物形成复合物,但在生理液中则不会^[23]。

制粒过程中黏合剂的种类和用量影响溶出速率。许多黏合剂是亲水高分子,它们的溶解度和溶出速率和分子质量相关。质量控制试验,如黏度检验可以作为聚合物的原材料试验之一。但是,制粒的一个优点是它使得药物表面润湿,一旦颗粒崩解,可以提高药物的溶解度。润湿剂,如十二烷基硫酸钠能显著提高直接压片处方中水难溶性药物的溶出度。

辅料中最需关心的可能就是润滑剂,尤其是硬脂酸镁,它不仅疏水,而且具有层状晶体结构。和其他组分一起混合时,硬脂酸镁会分成细层覆盖在其他组分的表面,使它们疏水。因此硬脂酸镁带来的问题和工艺密切相关。例如,混合时间仅相差2min能极大改变成片剂的溶出模式。由于直接压片处方具有更高的比表面积,所以相同用量的硬脂

酸镁混合相同的时间会使直接压片处方的基质比制粒处方的基质更疏水。混合过程中不同混合器的剪切力大小很大程度上影响了硬脂酸镁的分布^[24]。不同供应商供应的硬脂酸镁性质不同,有时同一个供应商不同时间供应的性质也不同^[25]。因此需要起草原材料规范,在含有该润滑剂的产品生产过程中严格按照标准操作规程(SOP)操作。除国家处方集中列出的规范,有必要建立更多的采购规范,如堆密度和叩密度、粉末流动性、粒径大小、表面积、水合度和形态等。

生产工艺对方剂的影响

片剂制备过程包含许多单元操作:粒径的减小和分筛、混合、制粒、干燥、压制和(经常)包衣。和这些过程有关的许多因素都会严重影响含量均匀性、生物利用度或稳定性。下面列出了部分影响因素。

(1) 粒径减小:

- 粒径不均会导致物料分层;
- 静电力使混合不完全;
- 晶型的改变影响溶解度。

(2) 混合:

- 混合不好或未混合导致药物分布不均;
- 与润滑剂过度混合导致溶出速率下降,影响可压性。

(3) 制粒:

- 黏合剂和药物混合不均会产生药物过多或过少的细粉;
- 水分残留使药物分解;
- 粒度不均匀(太多或太少细粉)影响可压性或均匀性。

(4) 压片:

- 压力不均匀影响溶出度;
- 料斗和供料器中混合质量下降导致含量均匀性差;
- 供料器中外加的剪切力降低溶出速率。

(5) 包衣:

- 片子或小丸包衣不均或不完整会产生不同的溶出模式。

验证新设备或新规程时,取样方法必须反映出被测材料、混合粉末的质量、制粒时的湿度以及包衣完整性。

生产中另一个可能产生问题的环节是返工。当成品未达到硬度、含量均匀性、崩解、溶出或外观要求时,会要求返工。返工应有可遵循的规程,它也是新药报批(NDA)和新药报审简表(ANDA)的一部分。虽然现在返工比过去少了,但是有些价格很高的原料药,返工仍是合理的,但会有以下问题:润滑剂分布过度导致可压性和溶出度降低;返工的片子中分布的衣层碎粒会降低溶出速率;直接压片填充剂的硬化使可压性下降,尤其是第一次加工的压片压力较高时。原料药为水溶性药物时,不太会导致溶出

度问题。

系统的处方开发

以前,制剂研究都很少会奢侈地采用扩大实验设计。加快上市步伐的紧逼,时间和人力的限制,阻止了人们全面检查和完全了解大多数药品的处方。虽然最近制药系统处方研究的步伐没有减慢,但快速的转变意味着处方研制人员必须快速收集信息,并据此做出决定。发生错误的窗口变窄了,处方研制人员不能再依靠经验采集数据,从而获得可上市处方需要的关键性的剂型信息。为了有可能使用SUPAC(放大和批准后变更)的管理政策,系统的开发方法也是值得的,因为它能提供研究数据向管理当局证明这些变更的合理性。

通过使用统计工具如多元分析、响应面方法和人工智能,系统的处方开发已取得了巨大的进步。

1. 试验设计

在长时间内,有效的试验设计可以节约时间和避免代价高的错误,许多制药公司已成立部门专门准备试验设计和分析。如果没有统计学家,处方研制人员也能够用很多商业试验设计软件包(SAS、JMP、STATGRAPHICS、DESIGN EXPERT)在个人电脑上进行试验设计。同样的软件包也可用于数据分析和报告。

统计试验设计的早期方法包括筛选设计,如二水平完全或部分析因设计或 Plackett-Burman 设计。有意识地混淆试验结果可减少试验次数。最终,筛选设计为后期研究减少了变量数目。

后期的中心试验设计包括响应面方法学优化处方,如中心组合或 Box-Behnken 设计。这些方法能让试验者一次同时评价几个变量的作用,而不用研究每个可能的变量组合的作用。这样就得到了关键变量的系统确认以及处方和工艺的优化。生成的响应面能给处方研制人员有关变量对响应值(如药物溶出度)的图示说明。可供试验者选择的设计和模型数目众多,恰当的选择取决于变量和可能的响应值的数目。如果没有统计学家咨询,试验设计一般可参考设计软件手册。

2. 人工智能方法

在人工智能方法中习惯于处方研制的是专家系统和人工神经网络。专家系统(ES)是一种智能的计算机程序,它能获得在特定领域有经验的专家的专业知识。它们被设计成模仿专家解决问题的程序。20多年前它被开发用于其他应用,现在专家系统在制药技术领域是一个相对较新的概念。在有规则的系统里,知识高度结构化,常常以条件语句代表一系列表达信息间关系的规则。这些语句指定了采取的行动或遵循的建议。这些系统能节约开发时间,简化处方研制,为制定处方提供理论,作为初学者优秀的教学工具,积累保存知识和专家经验。专家系统不能创新,

有一定的局限性,只能处理能预料的情况。它们必须被设计成能处理每个偶然事件。例如为片剂处方^[26]、排除工艺故障^[27]和选择混合器^[28]研发的专家系统。

人工神经网络(ANN)在其他领域应用了约40年,像专家系统一样,最近才被应用于药物开发。ANN是以计算机为基础的程序,试图模拟大脑的某些功能,例如学习、归纳或提取经验。它们能分辨对应于事实(“知识”)的关系或模式。ANN模型可简单地认为是多元非线性回归模型。对于将来的工作,通过ANN,试验生成的数据和信息可以相对简单地转化成知识,使处方研制人员至少能创立出一些领域的特殊规则,即使这些规则是有限的。但是,ANN的有效性受限于选择的训练数据。一个限制是,在大多数情况下,ANN缺少说明能力,说明结果合理性有困难。产品开发应用的例子包括从材料和工艺变量的知识预测制剂模型和片剂特征^[29]、从速释处方预测药物释放^[30]。混合系统的开发,即专家网络,把ANN和ES结合起来,能够发挥ANN和ES的长处,避免各自的缺点^[31,32]。

3. 处方开发

无论在大的实验室还是小的研发机构工作,处方研发人员被告知要全面考虑开发工艺,以评定出针对其特别需要和资源的最合理方法。在片剂处方合理化的许多方法中,马里兰大学研究者和FDA科学家合作采用的策略^[33]是根据SUPAC指南考察药品开发工艺。

这个通用计划强调评估处方和工艺变量对生物利用度和生产的影响。图1的流程图可形象化地说明研究方案。这个模型开始是处方前研究阶段,获得药物的物理化学和生物药剂学性质。处方前研究的一个成果就是确定生物药剂学类别(BCS),这能为处方的确定提供重要指导。对于

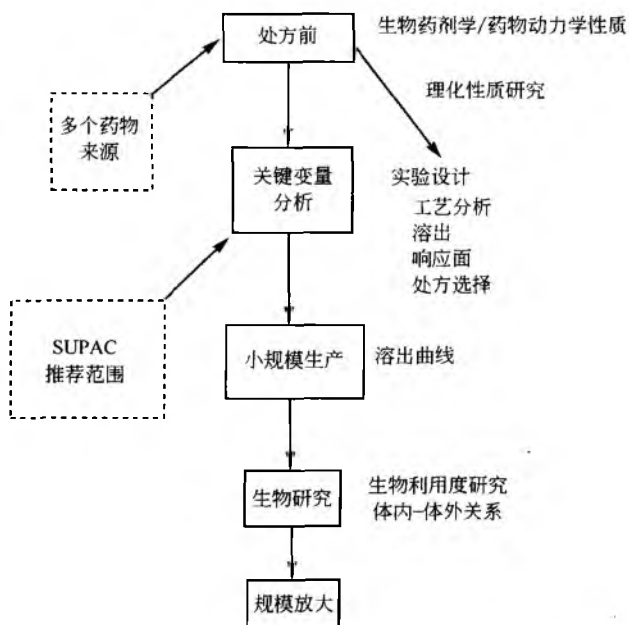


图1 马里兰大学和FDA合作研究项目采用的研究模型^[33]

多来源的药物,需要考虑不同的来源。处方前研究生成了一个信息包,为处方设计、建立合理的假设检验和关键变量的研究提供指导。

在关键变量分析阶段,为了评价较小规模生产中的重要处方和工艺变量,创建了统计试验设计(例如,方差、Box-Behnken)。在这些研究中,成分变化的范围至少要包含在关于口服速释固体制剂放大生产的AAPS-FDA研讨会上或SUPAC所推荐的范围内。这个阶段之前是开发阶段,通常研究和确定变量和水平,确定生产方式。试验处方至少要用溶出性能、含量均一性和质量差异来评价。在这些研究的基础上,将选定要生产的供生物研究的特定处方。

在小规模临床生产阶段,制剂是在GMP条件下生产的,用于可能的临床试验。比起前面的阶段,这一阶段的生产规模更大。试验设计已经选定,但是如果通过较早的试验可以排除一些变量,生产的处方数量可减少。

生物研究阶段的目的是建立体内外关系。如果建立了适当的体内外相关性,只要在研究的变量中说明什么是重要的,什么不是,就可以用溶出度替代生物研究了。

在放大阶段,生产出更大量的制剂。处方还需考察大规模生产是否会提高某些变量的重要性。

数据的统计分析为预测每次由于增加产量改变了一个或多个处方或工艺变量(如辅料的水平或混合时间)而引起的溶出变化提供了机会。

这里介绍的开发模型可能和一些处方研究项目不同,小规模批次产品不做生物研究。早期生物研究的主要优势是早期IVIVC的潜力,以及在后来的工作中用溶出试验代替的可能性。放大和中试对制剂处方变化的影响,在这里没有过多叙述,Razc对此做了综述^[34]。

参考文献

1. Chowhan, Z. T. Excipients and Their Functionality in Drug Product Development. Pharm. Tech. 1993, 17 (9), 72.
2. Czeisler, J. L.; Penman, K. P. Diluents, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 1st Ed.; Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1991; 4, 40-43.
3. Blecher, L.; Ohmae, T.; deJong, H. J. Tri-PEC: Reports from IPEC-Americas, JPEC, and IPEC-Europe. Pharm. Tech. 1994, 18 (8), 53.
4. Raleblian, J.; McCrone, W. J. Pharmaceutical Applications of Polymorphism. Pharm. Sci. 1969, 58, 911.
5. Matsumoto, T.; Nobuyoshi, K.; Iliguchi, S.; Otsuka, M. J. Effect of Temperature and Pressure During Compression on Polymorphic Transformation and Crushing Strength of Chlorpropamide Tablets. Pharm. Pharmacol. 1991, 43, 74.
6. Brittain, H. G. Raw Materials. Drug Devel. Ind. Pharm. 1989, 15, 2083.



7. Schwatz, J. B. The Instrumented Tablet Press: Uses in Research and Production. *Pharm. Tech.* 1981, 5 (9), 102.
8. Hunter, B. M.; Fisher, D. G.; Pratt, R. W.; Rowe, R. C. A High Speed Compression Simulator. *J. Pharm. Pharmacol.* 1976, 28, 65.
9. Maganti, L.; Celik, M. Compaction Studies on Pellets I. Uncoated Pellets. *Int. J. Pharm.* 1993, 95, 29.
10. Muller, F. X.; Augsburger, L. L. The Role of the Displacement-Time Waveform in the Determination of Heckel Behavior Under Dynamic Conditions in a Compaction Simulator and a Fully Instrumented Rotary Tablet Machine. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994, 46, 468.
11. Roberts, R. J.; Rowe, R. C. The Effect of Punch-Velocity on the Compaction of a Variety of Materials. *J. Pharm. Pharmacol.* 1985, 37, 377.
12. Hiestand, E.; Smith, D. P. Indices of Tableting Performance. *Powder Tech.* 1984, 38, 145.
13. Augsburger, L. L.; Shangraw, R. F. Effect of Glidants in Tableting. *J. Pharm. Sci.* 1966, 55, 418.
14. Fed. Reg. 21CFR, Ch. 1; (4/1/87 Ed.) Part 32; 320.
15. Amidon, G. L.; Lennernas, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability. *Pharm. Res.* 1995, 12, 413.
16. INTGUIDE. 1R9. FDA Center for Drug Evaluation and Research; Rockville, MD, 1994.
17. Lucisano, L. J.; Franz, R. M. FDA Proposed Guidance for Chemistry, Manufacturing, and Controls Changes for Immediate-Release Solid Dosage Forms: A Review and Industrial Perspective. *Pharm. Tech.* 1995, 19 (5).
18. Wood, J. H.; Syarto, J. E.; Letterman, H. J. Improved Holder for Intrinsic Dissolution Rate Studies. *Pharm. Sci.* 1965, 54, 1068.
19. Koparkar, A. D.; Augsburger, L. L.; Shangraw, R. F. Intrinsic Dissolution Rates of Tablet Filler-Binders and their Influence on the Dissolution of Drugs from Tablet Formulations. *Pharm. Res.* 1990, 7, 80.
20. Kaplan, S. A. Biopharmaceutical Considerations in Drug Formulation Design and Evaluation. *Drug Metab. Rev.* 1972, 1, 15.
21. Jacobs, A. L. Determining Optimum Drug/Excipient Compatibility Through Preformulation Testing. *Pharm. Manuf.* 1985, 2 (6), 43.
22. Monkhouse, D. C.; Maderich, A. Whither Compatibility Testing. *Drug Devel. Ind. Pharm.* 1989, 15, 2115.
23. Hollenbeck, R. G.; Mitrevej, K.; Fan, A. Estimation of the Extent of Drug-Excipient Interactions Involving Croscarmellose Sodium. *Pharm. Sci.* 1983, 72, 325.
24. Bolhuis, G. K.; deJong, S. W.; Lerk, C. F. The Effect of Magnesium Stearate Admixing in Different Types of Laboratory and Industrial Mixers on Tablet Crushing Strength. *Drug Devel. Ind. Pharm.* 1987, 13, 1547.
25. Danserean, R.; Peck, G. E. The Effect of the Variability in the Physical and Chemical Properties of Magnesium Stearate on the Properties of Compressed Tablets. *Drug Devel. Ind. Pharm.* 1987, 13, 975.
26. Rowe, R. C. An Expert System for the Formulation of Tablets. *DTI Manuf. Intel. Newslett.* 1993, 14, 13-15.
27. Murray, F. J. The Application of Expert Systems to Pharmaceutical Processing. *Pharm. Tech.* 1989, 13 (3), 100-110.
28. Lai, F. K. Y. A Prototype Expert System for Selecting Pharmaceutical Powder Mixers. *Pharm. Tech.* 1988, 12 (8), 22-31.
29. Kesavan, J. G.; Peck, G. Pharmaceutical Granulation and Tablet Formulation Using Neural Networks. *Pharm. Dev. Tech.* 1996, 1 (4), 391-404.
30. Ebube, N. K.; McCall, T.; Chen, Y.; Meyer, M. C. Relating Formulation Variables to In Vitro Dissolution Using an Artificial Neural Network. *Pharm. Dev. Tech.* 1997, 2 (3), 225-232.
31. Turban, E. Expert Systems and Applied Artificial Intelligence; Macmillan Publishing Co.; New York, 1992.
32. Caudill, M. Expert Networks. *Neural Network PC Tools*; Academic Press; New York, 1990; 189-214.
33. Augsburger, L. L.; Shangraw, R.; Lesko, L.; Williams, R. An Approach Toward Establishing a Scientific Foundation for Interpreting Regulations and Workshop Reports on Scale-Up and Post Approval Changes. *Pharm. Res.* 1994, 11 (10), S-161.
34. Racz, I. Drug Formulation; John Wiley & Sons; New York, 1989; 25-27.

参 考 书 目

- American Pharmaceutical Association and the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Ed.; American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press; Washington, 2000.
- Armstrong, A. M.; James, K. C. Understanding Experimental Design and Interpretation in Pharmaceutics; Ellis Horwood Ltd; Chichester, UK, 1990.
- Franz, R. M.; Browne, J.; Lewis, A. Experimental Design, Modeling, and Optimization Strategies for Product and Process Development, Pharmaceutical Dosage Forms; Disperse Systems, 2nd Ed.; Lieberman, H. L., Rieger, M., Banker, G., Eds.; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1996; 1, 427-514.

P

Peck, G. E.; McCurdy, V. E.; Banker, G. S. Tablet Formulation and Design, Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, 2nd Ed.; Lieberman, H. L., Lachman, L., Schwartz, J., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1989; 1, 75—130.

Polderman, J. Formulation and Preparation of Dosage Forms; Elsevier/North-Holland: New York, 1977; 3—28.

(何 蔚 译)



片剂的测定

Saeed A. Qureshi

Therapeutic Products Directorate, Health Canada, Tunney's Pasture, Ottawa, Canada

引言

片剂可能是年代最久远最为普通的药物剂型。其普遍性是由于服药方便不需要医护人员的帮助和管理,这就给患者提供了自由且有效的重复服药的方法。片剂一般不会只含有活性成分。实际上,片剂是一种或多种活性成分与一定量的非活性成分或辅料的混合物。在片剂配方时需要加入辅料的原因有很多,从处理小剂量的活性成分到产品的色泽及形状等美观方面。但是,片剂的最基本和最关键的目的是精准可重复地将活性成分进行给药。因此,从这方面来看,普遍认为片剂是给药装置。在片剂开发过程中也强调了对于主要活性成分的控制释放,而不是像普通片剂那样的快速崩解和释放。因此这些片剂产品也被赋予了不同的名称,如缓慢释放片剂、延长释放片剂、控释片剂、缓释片剂、延迟释放片剂等,来反映药物的释放性质。这些改进的产品也进一步给患者提供了便捷,以减少服药的频率,从一天三次减少到一天一次,因此也增加了依从性。但是,对于建立片剂产品的质量,其基本原则还是一致的,例如,确保产品能以精准和可重复的方式输送指定的活性成分。因此,片剂测定大致分为三个方面:

(1) 对于活性成分和产品本身性质的确认(定性、定量、杂质,完整度等)。

(2) 建立人体内外药物的可用性,如果需要,可以提供动物的数据。

(3) 建立稳定性档案来预测其保质期。

本章对现有的用于该目标的技术进行了概述,并对公认的标准进行了讨论。将普通释放产品作为一个模型,介绍了北美的标准、进行试验的思路以及所采用的仪器和操作。因不同国家和地区之间指导原则有可能不同,因此还提供了有关产品测试的更详细的相关参考文献^[1~4]。

测试片剂的性质

在这一类测试中,需要建立评价片剂是否符合标准的方法。例如,活性成分的性质(鉴别)、预期含量(含量测定)、纯度(有关物质),片剂与片剂之间药物量的均匀性(剂量单位均匀度),通常这些测试方法会在药典中以一定的名字命名,例如,括号中所给的名字可以参考《美国药典》的术语。除了这些测试,其他如脆碎度、硬度、崩解度等,也要进行测试,在下文中会一一介绍。虽然对于单个测试可以有大量的操作规程介绍,但多数重点会放在药典描述的操作规程,因为这些相对易于操作并且在世界范

围内认可。

1. 鉴别

首先也是最重要的片剂测试是确认片剂含有标签所示的活性成分。为此,通常要使用一定数量的片剂,例如10~20片,将其碾碎并用合适的溶剂提取。提取物,经过或不经浓缩步骤,通常和可信的标准溶液一起进行色谱分析。对药物的鉴别是基于相似的紫外吸收波长或色谱分析中相似的保留时间。这个测验通常是定性的,会用到色谱技术或色谱与质谱联用这种更加复杂的方法。但是,对于常规的质量控制,更简单的技术,如薄层色谱或带紫外检测器的高效液相色谱是使用最多的。

2. 含量测定

我们可以认为这个测试是定性分析的定量版本。同样,取10~20个药片碾碎,将活性成分溶于合适的溶剂或用合适的溶剂萃取。用专属的验证过的光谱或色谱法测定所得溶液的浓度,并与标准溶液作比较。结果用期望值/标示量的百分比报告。虽然每种产品的分析结果指示会有所不同,但通常单个活性成分的预期范围为标示量的90%~110%。

3. 含量均匀性

这项测试是为了确认片剂与片剂之间活性成分含量的一致性。通常有两种方法来确认:质量差异和含量均匀度。

如果活性成分不少于片重的50%并大于50mg,就可以采用质量差异法确认剂量单元的均匀度。取10片各自称量,并记录下结果。

如果采用含量均匀度法,同样10片,用含量测定项下的分析方法分别测定其含量。对于活性成分少于50mg或低于50%片重的片剂必须使用含量均匀度法。推荐使用含量均匀度法,因为它比质量差异法更为精确地反映了片剂之间活性成分的差异。

含量均匀度的指标是在85%~115%的范围内,相对标准偏差不大于6%。

4. 杂质

片剂中所含的杂质可能属于不同的类别,如因为污染或掺杂而引入的外来物质;有着显著的不期望产生的生物活性的有毒杂质,尽管含量很低,需要采用专属的鉴别和定量分析方法;被视为许多药物制剂特征的共存物质,但这些东西并不被认为是杂质,如光学和几何异构体;普通的杂质是那些无害的,实际上在所含的量下没有明显的生物活性。这些杂质可能源于合成、制备或产品的降解。

通常,大多数杂质被确证来自于原料。但是,从成品的角度来看,产品的杂质分析只针对有毒杂质。这种情况下,就需要确证产品没有特异性杂质还是杂质在可接受的范围内。

5. 脆碎度

这项测试是测定在一定条件下未包衣片剂的脆碎度,即片剂表面在受到机械冲击和磨损时会出现裂片和破损的程度,商业用仪器称为脆碎度仪,可用于这项测试。脆碎度仪基本上由一个直径为283~289mm、宽36~40mm的圆筒组成,圆筒由透明的塑料制成(图1)。圆筒附着在装置的水平轴上,其转速为 (25 ± 1) r/min,圆筒每转一圈片剂都以曲线状投影进行翻滚,从圆筒的中间至外壁半径为75.5~85.5mm。因此,每一转片剂都在翻转滑动,撞击到筒壁上或片剂之间相互碰撞。通常,需要同时测定10片,如果片重小于等于0.65g,则需要测定20片。在100转之后,通过称量进行评价。如果总质量减少大于1%,则片剂该项试验不合格。通常,该测试只进行一次,如果出现明显的破片、裂片,说明该批样品也不合格。

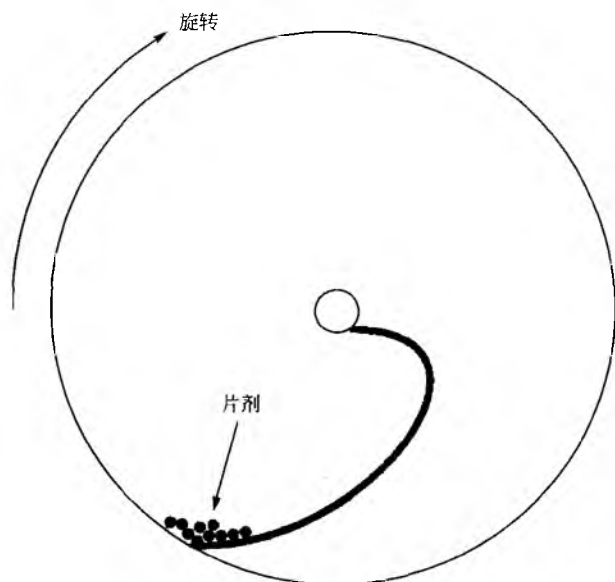


图1 脆碎度仪示意图

6. 硬度试验

片剂需要有足够的机械强度来经受住生产、包装、运输和分发过程中的撞击,像前面所说,硬度和脆碎度是评价片剂强度最常用的指标。除了脆碎度,测试都与脆碎度相似,都是为了测定片剂的易碎程度。如果片剂比其期望更易碎,则脆碎度试验可检测出其质量不合格。但是,另一方面,如果片剂太坚固,则脆碎度试验检测不出其缺陷,但片剂硬度试验就会检测出其缺陷。

最常用的测定片剂硬度的仪器是 Schleuniger 仪。该仪

器和其他更新的电子操作测试仪器一样可以消除老式仪器测量时所固有的不同操作人员造成的误差^[5]。

通常,将片剂破坏所需的力用千克或磅来表示,但需要注意的是,因为结果会随着测试仪器的类型或厂商而改变,不同类型的仪器所得的结果是不能进行直接比较的。因此,在特定的研究中,必须使用相同的仪器。

7. 崩解度试验

崩解度试验是测试片剂崩解成粒料或更细的粒子有多快的试验。试验假设如果片剂在很短的时间内崩解,如5min,则药物会如期释放,所以就不用担心药品质量问题。虽然这项测试在药典中的一些产品中使用,但将逐渐会被溶出试验取代,这将在下文中提到。

需要的时候,试验采用特殊设计的仪器如崩解仪来进行操作。图2是崩解仪的示意图,仪器使用带有6根管子的篮,底部装有金属筛网,每根管子中放入一片片剂,由塑料重物将其保持在原处。六根管子组装在一起,加有六片片剂,用一根金属棒悬挂着,并以固定的速率做垂直运动。当六根管挂在一起,它们在水溶液或缓冲液中做垂直运动。记录每个片剂的崩解时间,并应在规定的时间范围内。

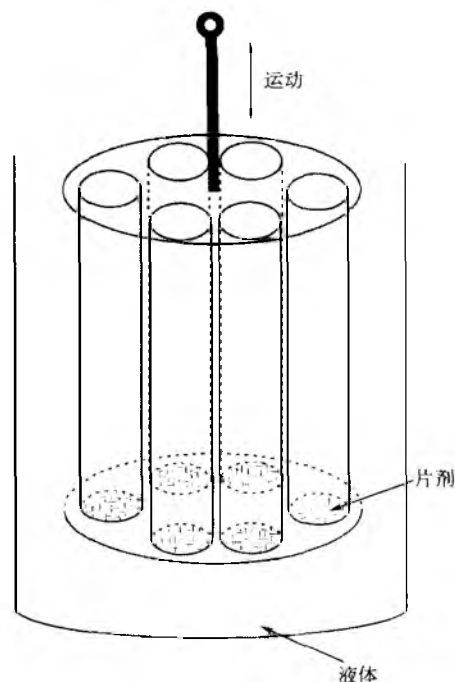


图2 片剂崩解仪示意图

制剂有效性

如前所说,用化学分析来检查药物的质量,能保证其成分符合质量要求。但并不能保证产品中的活性成分会以可接受的方式来释放。有很多因素如粒子大小、晶型、生产中的压制等,单独或一起,都能严重影响药物从产品中的释放从而影响其药效。这就是对药物释放特性为什么必

须进行评价和确证的原因。围绕这个概念的质量保证代表了产品开发和以后质量保证的主要内容。建立产品药物释放特性的黄金标准是基于体内的研究,如测定人体内生物利用度(BA)。

而且,在现实中存在产品处方和生产中的变化,在很多情况下这种变化是不可避免的。例如,供应商方面所提供的成分有变化或者生产成分或设备本身有变更。但是,这些变化对药物释放曲线以及产品的安全性和有效性的影响令人担心。唯一的“黄金标准”分析试验是进行生物利用度研究,来确证新产品是否与早期产品或参照样品相似。但是,进行生物利用度研究在产品生产中是最昂贵耗时的,除了费用和时间的考虑,伦理学也限制了在人体上进行这些研究。

因此,由于费用、时间和伦理学的限制,不可能总是在人体上进行药物释放试验,体外药物释放评价是最好的选择。为了这个目的,建立片剂溶出试验已成为产品开发和质量保证的一个手段。试验在产品开发的每个阶段都要进行,包括在生产中和生产后。本章介绍了关于制剂有效性的相对详细的概念,以及目前方法存在的问题和困难,以使读者可以意识到未来发展的方向。

1. 体内药物释放评价

要评价释放性质,我们需要研究产品的生物利用度和(或)生物等效性(BE)特性。生物利用度和生物等效性都是药代动力学研究的分支。因此,我们需要熟悉一些药代动力学的基本知识。为此,下面将叙述必要的药代动力学概念,详情请见参考文献[6,7]。

2. 生物利用度研究

当药物通过胃肠道(GI)吸收进入血液(全身循环)时,它分布在全身,并到达作用位点。分布同时,由于代谢药物从血液中消除或由尿排泄,因此在任何时间,血液中的药物浓度是吸收和消除的净结果。在初始相中,药物的吸收速率远大于消除速率,因此,吸收相占主导地位。当所有药物都吸收后,消除相占主导地位,虽然也有例外存在。经典的给药后血药浓度曲线见图3。从分析化学的观点看,通常不是分析血液,而是分析提取的血浆或血清,以反映血液中的药物水平。

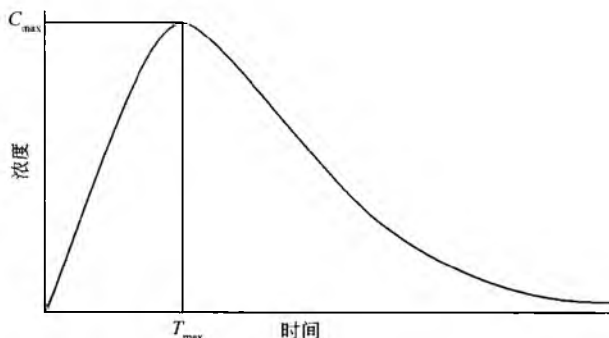


图3 血浆药物浓度-时间曲线

达到最大血药浓度(C_{\max})的时间称为 T_{\max} 。血药浓度曲线开始上升部分的斜率反映了药物进入全身循环的速率。释放速率是非常关键的,它取决于产品的性质。最后部分血药浓度下降的斜率反映了药物从体循环中消除的速率。如果我们要绘制图3的半对数图,即时间和血药浓度的对数图,曲线的最后部分就是一条直线,因为消除速率是指数型的。消除速率通常用参数 k_e 来表示,也就是消除速率常数。这些参数,会分别或共同决定体循环的吸收。

另一项重要的参数是药-时曲线下面积(AUC),它反映了药物吸收的程度。从产品的质量方面看,了解这些药代动力学参数是很重要的。从这些参数,我们可以知道片剂中药物在体内释放的性质。

3. 药代动力学参数计算

很明显 C_{\max} 和 T_{\max} 是从试验结果或曲线上观察直接得到的。通常AUC通过梯形法计算得到,即相邻两时间点血药浓度的算术平均值与相邻两时间之差的积,例如, $(t_2 - t_1)(C_2 + C_1)/2$,直到最后一个血浆浓度点。这样的曲线下面积称为 $AUC_{0 \rightarrow t_i}$ 。但是,最后测定点后面药物仍然在体内呈指数代谢,所以剩下的面积用 $AUC_{t_i \rightarrow \infty} = C_i/k_e$ 来表示,这样 $AUC_{\infty} = AUC_{0 \rightarrow t_i} + AUC_{t_i \rightarrow \infty}$ 。

为了建立如片剂之类的产品的药物释放性质,我们必须测定该药物的生物利用度。相对于一些标准,生物利用度是对药物达到全身循环的速率与量的衡量。由于 C_{\max} 、 T_{\max} 和AUC是对血浆中药物可用性的反映,这些参数用来确定产品的生物利用度。通过比较生物利用度研究所得的药代动力学数据,可以确定是否具有相似的体内释放性质。

从药物质量角度看,生物利用度的概念是很关键的。虽然,如前所述,物理和化学测试对测定片剂质量是关键,但从药品安全有效的观点来说,生物利用度研究是必须的。甚至当片剂的含量和质量都在规定范围内时,药物在人体内的释放也有可能与预期不一致,不合格的产品对于使用者的健康是很危险的。因此,生物利用度研究在片剂开发的和生产的许多阶段都需要进行,特别是在产品开发和收到上市许可时。片剂产品的生物利用度方案样本如下[8]。

生物利用度比较试验通常在健康人中进行,一般会招募12~30名志愿者,人数根据药代动力学参数的差异而定。为了将所得的参数的差异减少到最小,健康志愿者必须满足一些要求,如年龄在18~50岁,体重正常,无疾病和服药。研究方案要得到机构伦理委员会的认可。

在禁食一夜后,会给予受试者一定剂量并以一定量的液体服用(250mL水)。在服药后规定的时间,会提供每位志愿者一顿标准餐,所用的标准条件是为了使所有志愿者的结果不会受到不利影响。

在给药后,会从志愿者身上抽取血样。取样的时间点应能准确确定 C_{\max} 。因此,通常在曲线较低的部分会频繁取样。同样,在消除相也应该有足够的样品点来确定消除速率常数。取样时间应该使得AUC含有大多数药物(至

少 80%)。

血浆样品储藏供测定之用。样品用验证过的分析方法进行分析^[9]。最常用的方法是色谱法,如 HPLC 或 GC。这些方法,包括储存条件,都必须经过验证,以保证精准的测定结果。需要从每个人的血浆中的药物释放曲线确定药代动力学参数。这些参数的平均值可以反映产品的生物利用度。

4. 生物等效性研究

生物等效性研究并不是一项实验研究,而是生物利用度比较研究的报告形式。在生物等效性研究中,通过生物利用度研究来比较参照品和测试样品的结果。测试样品可能是新生产的样品或成分有改变或是仿制产品。实际上,整个仿制药工业就是基于对原创品和他们的产品进行生物等效性试验而将产品推向市场的。这项研究需要按照统计学有效的途径与设计,通常是交叉设计,即在第一个周期,一半志愿者给予一种剂型,而在第二个周期则相反。

一旦生物利用度比较研究的试验部分结束,得到了各自的药代动力学参数并进行了比较,当参数符合要求时可以宣布产品生物等效。试验参数及其要求可能国与国之间有所不同。但是最普遍的标准是美国 FDA 制定的。在这种情况下,参数(C_{max} 和 AUC)的对数转化值的 90% 的置信区间应该在 80%~125% 的范围内。

因此,如果我们要确定任何变化对生物利用度的影响,或者开发新处方或产品并与老产品进行比较时,这些生物利用度/生物等效性研究一直是标准的,并且对显示新产品的安全性和有效性是必须的。但是,从常规质量控制角度来看,以及为了确保处方或生产工艺细小改变后产品的质量,要求进行生物利用度/生物等效性研究会因经济学以及伦理学的原因变得很困难。因此,常常只进行体外药物释放试验。在下面的叙述中,对体外以及体内方法的详细情况进行了介绍,但在此之前,首先对现有溶出度试验方法进行了简短的描述。

5. 体外药物释放评价

药物释放度试验是评价口服固体制剂如片剂的释放性质的。在本章中,也称为体外药物释放评价,与体内药物释放评价相对应,后者通常用 BA/BE 中人体的血药浓度来测定。进行溶出试验的基本理由是如果药物从胃肠道吸收,通常要求它必须是溶解的。因此为了使药物吸收,它必须从产品中释放出来溶解在胃肠液中。这样,溶出试验就可以成为用来评价产品质量的正式的分析试验,研究其释放速率与释放量,即释放性质。

通常,溶出试验用溶出仪进行,包括两个主要可变因素:溶出介质(性质与体积)和搅拌与混合机制。

5.1 溶出介质选择

由于溶出试验是模拟药物在人胃肠道中释放而进行的试验,所以通常建议介质使用水性缓冲液,其 pH 为 1~8。

通常使用盐酸(0.01~0.1mol/L)来模拟胃液, pH4.0~6.8 的磷酸或乙酸缓冲液来模拟肠液。最近,对其他相关溶出介质提出了建议^[10,11],要求能反映胃肠道液体的组成、体积、流速和混合方式。其体积一般在 250~1000mL,但是选择更小或更大体积的情况也逐渐增多。选择溶出介质体积时关键是要考虑到药物在介质中能自由溶解,不需要担心在介质中达到饱和。如果药物溶解度低,可加入十二烷基硫酸钠等增溶剂来增加溶解度。也可加入低浓度的乙醇促进低溶解度药物的溶解。但是,要避免高浓度的乙醇,因为会导致误导和不具有代表性的结果。溶出试验中介质的温度一直保持在 37℃。

5.2 搅拌与混合机制

第二个溶出试验的决定性因素为产品在溶出介质中的搅拌与混合装置。混合装置,实际上是溶出仪器,有多种类型。商业上有 4 种不同类型的装置,都已得到法定认可。这些装置为:①桨法;②篮法;③流通池法;④往复柱筒法。要详细了解这些仪器,读者可参考任何药典如《美国药典》等^[12]。下面将简要介绍这些仪器及其搅拌机制。

桨法:在此情况下,用一种倒置的 T 形搅拌器进行搅拌。将产品置于圆底玻璃杯中的介质中(图 4),搅拌通过旋转主轴进行,通常速率控制在 50~100r/min。在一定时间取样,通过常规分析方法如紫外或色谱测定溶出百分率。

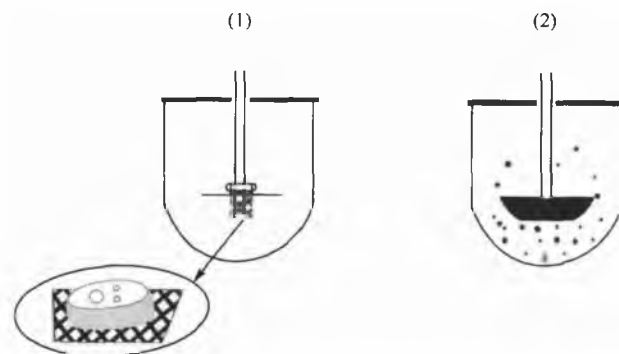


图 4 USP 药物溶出仪示意图

(1) 篮法; (2) 桨法

篮法:这种方法与前一种方法很相似,只不过将倒置的 T 型桨换成圆柱形金属网篮(图 4)。片剂产品置于篮内,篮与主轴相连,提供篮转速。溶解的药物从篮中释放并溶于大量介质中。在这种装置中,当产品崩解时,粒子会落在篮底部不溶解,从而限制了药物的溶解。因此,对于这种装置,我们可以预计到一些奇怪的结果,至少对于某些产品是这样的。

流通池法:在这种装置中,已经没有了搅拌器(图 5)。产品置于溶出介质的流通途径中。溶解的药物被连续地清除,流出的液体用来测定溶解的药物。如果需要,流出的液体可以返回介质储池供循环使用,这样可以提供一个封闭循环操作,其体积是有限的。但是,其最大的优点在于开放操作,溶出介质体积特大。这个系统在低溶解度药物

的产品中使用很普遍。其相对于浆法与篮法的主要缺点是操作更困难。

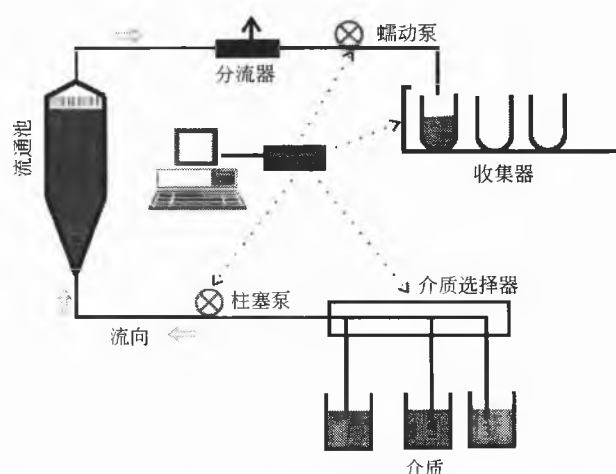


图5 流通药物溶出试验仪（流通池法）示意图，也称为 USP 第4法

往复柱筒法：这个系统可以想象为一系列试管或容器的集合，是一套六管装置（见图6）。每套容器中的介质具有相似或不同的性质，如 pH 等。在有金属网底的空心圆柱体中放置药物，每个容器作垂直运动。溶解的药物与外部的介质混合。在设定时间点，含有剩余药物的柱筒升起移至下一套装有新鲜介质的容器中，这个过程要重复好几次。这种装置提供了最强的搅拌，除了这个优点，即产品可以在不同的 pH 条件进行测定，系统看起来似乎有严重不足。因为其提供的体积是有限的，如此一来，药物的溶解度就成为一个问题。另外，药物在垂直移动管中从一个介质转移到另一个介质时有可能携带液体。此外，目前这种系统还不能无人监控运行。

在上述的四种仪器中，文献中报道的大多是篮法和浆法。

6. 结果及限度报告

通常，溶出的结果用累计药物释放百分率与时间表示。现在，大多数限度是基于单一的时间点，如 30min 释放或溶出不少于 85%。但是，更多的报告是多个时间点的药物释放百分率，可显示药物释放模式，通常称为“溶出曲线”。

一般地，溶出试验以 6 个剂量单位进行。大多数商业用仪器都可以 6 个同时进行，这样就可以节省时间与资源，并使结果有更好的可重现性。虽然试验是一组 6 个，但报道的是单个的片剂。最常用的限度形式是药典的形式，如 USP，这样的形式同样也被其他药典所采用。这些法定标准用水平或阶段来表示，每个阶段都有其限度，这是基于个体或平均结果的。对于曲线，在考虑到每个样品时间点为独立的结果时，可以得到相近的限度。需要注意的是平均值的标准差如标准偏差或变异系数都是不要求的。缺少标准偏差是现有溶出试验的一个缺点^[13,14]。

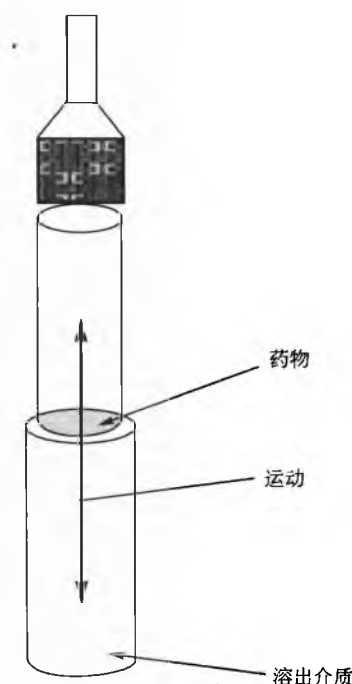


图6 USP第3法溶出试验仪，也称为往复柱筒仪

最近，一个称为混合取样的较新方法，也可用于报道结果^[15]。这种方法是基于报道多个样品，如 6 个样品的单一结果。关于这种方法的好处，目前可能还有争议。但是，该方法的一个明显缺点是掩盖一批或多批中片与片之间的差异，从而导致得到的信息质量降低。

至于曲线，引入了另一个参数来比较药物的释放（试验品与对照品），该参数称为相似因子或 f_2 因子^[16]。实质上，它反映了多个取样时间点两个样品释放百分率差值的负对数和。这个参数在 50~100 的范围内时可以认为曲线相似，因此而具有相似的释放性质。但是，现在对于支持这种方法有用性的信息还是有限的。

7. 体内与体外研究的选择

两种类型的研究都是用来评价片剂产品药物释放性质的。体内研究仍为黄金标准，但如前所述，由于伦理学和经济上的原因，没有必要总是进行体内研究。也有这种情况，只通过进行体外研究就可以确定其安全性和有效性^[17,18]。如果可以获得确定的体内体外相关性（IVIVC），即从药时曲线所得的体内释放能反映所观察到的药物溶出性质，就可以确信体外结果能反映体内结果。有很多途径可以对 IVIVC 进行观察与报道^[19~23]。但是，出于可靠性的目的，我们通常将体外药物累积释放结果与药代动力学数据中所得的体内累积释放结果进行比较。虽然在科学界对建立与报道 IVIVC 有很大的热情，但是很少有 IVIVC 例子能成功从体外结果预示体内结果，反之亦然。另一方面，缺乏体内体外相关性的例子更为普遍。例如，在研究建立 IVIVC 中^[24]，不同的扑米酮片剂的药物释放性质用体外

(溶出试验)及体内研究(BA/BE)来评价时,结果显示,即使不同的扑米酮片剂在体外溶出中有很大的差异,但其体内结果却相近。

而且,我们不能期望 IVIVC 对所有药物都适用。药物吸收进入全身循环取决于两方面的因素:①药物在胃肠道的释放;②药物对胃肠道组织的渗透性。如果药物的吸收依赖于渗透性,我们就不能期望 IVIVC,因为 IVIVC 是体外释放与体外吸收药物在体内出现的相关性。

基于药物的溶解性和渗透性,可将药物分为四种类型:①高溶解度高渗透性;②低溶解度高渗透性;③高溶解度低渗透性;④低溶解度低渗透性。这种分类被称为生物药剂分类系统^[25]。基于这种分类系统,我们可以期望低溶解度高渗透性的药物会有较好的 IVIVC。这种类型的药物,由于渗透性高,我们可以预计药物一旦溶解,就会通过胃肠道组织吸收。对于两类具有低渗透性的药物,由于药物吸收是渗透依赖性的,IVIVC 是不太可能出现的。而且我们也不可能看到第①种类型的药物即高溶解度高渗透性的药物会表现出 IVIVC,原因是如果药物很快溶解,例如在 15min 以内,我们可以预见胃肠道吸收系统会达到饱和或过载。因此,体内溶出的变化不可能在血浆浓度中反映出来。但是,如果将高溶解度高渗透性药物制成缓慢释放的产品,药物就会表现出低溶解度/低溶出度,这样就成为低溶解度高渗透性药物,从而使 IVIVC 变得可能。因此,IVIVC 不但依赖于药物的性质,也取决于产品的性质。

IVIVC 不成功的另一个原因可能是因为缺乏体外相关的测试环境。现有的方法学的重现性不好,而且体外搅拌与混合的性质也不好^[14]。因此,不可能很快实现 IVIVC 方法的成功。在这个领域还有必要进行改进。

尽管如此,最近,相继承认并接受了用体外结果代替体内结果对药品的安全性和有效性进行评价的方法。尤其美国 FDA 的一些指南^[26]允许用体外研究代替体内研究。在这个特殊的例子中,如果这个药物具有高渗透性与溶解性且吸收没有出现问题,产品在生产时有所改变后,它的体外释放性质相同,则其安全性和有效性有保证。对于这一类特定的产品,接受体外结果代替体内结果并不是基于 IVIVC,即产品具有高溶解性与渗透性且体外释放快(15min 内超过 85%),而是因为根据使用这种药物的经验认为它们不会有 BA 问题,并且也不可能引起潜在的健康危险。

简而言之,可以说 BA/BE 试验仍然是确定体内制剂产品能力的黄金标准。由于伦理学与经济的原因,BA/BE 利用度研究大多数是在产品开发和主要处方、生产工艺有所变化时进行。但是,体外测试是与其他分析方法一起进行,确定它们与体内测试是否相关,来确保产品的质量,尤其是预期的体内释放特性。因此,药物溶出试验在产品评价中已经成为一项重要而且必须进行的质量控制试验,以确定批与批之间的一致性。而且,在某些情况下,如速释产品中的易溶和高渗透性药物,可以用溶出试验代替 BA 研究。

产品稳定性评价

产品稳定性试验是确定产品质量的必要组成部分。药物制剂的稳定性参数会受到储存环境的影响(如温度、光照、空气、湿度),也会受到包装方式的影响。

了解处方的物理稳定性非常重要,原因是两方面的。首先,药品在货架上要尽可能长时间地保持其新鲜与美观。第二,在整个有效期内活性成分均可供患者服用。活性成分质量的下降可能是由于与辅料成分不相容、氧化、还原、水解或外消旋化等等原因造成的。

在稳定性研究时除了不用进行生物利用度研究,上述其他的试验在将产品包装后都要进行,以便宣布生产的产品质量合格。体外溶出试验是可以反映体内药物释放性质的。所用的分析方法需要验证,以表明其准确度与精密性不会受到降解产物的干扰。

活性物质和包装剂型的稳定性研究是实时的。长期试验在指定的温度与湿度下进行,储存条件要能代表世界上各个地区和国家的气候带的运输和分发所经历的储存条件。

通常要进行两种类型的稳定性研究:①常规;②加速。在加速稳定性试验中,产品储存在较高的温度和相对湿度下,来强迫或加速其降解来考察其变化。稳定性试验条件要看预期的市场环境而定。建议的方案如表 1 所示^[27]。

表 1 推荐常用的片剂产品稳定性试验方案

类型	条件	时间/月
长期试验	(25±2)℃/60%RH±5%	12
加速试验	(40±2)℃/75%RH±6%	6
替代试验	(30±2)℃/60%RH±5%	

注:在加速试验条件下储存 6 个月发生明显改变时需要进行替代试验。

参考文献

1. USP XXIV; The United States Pharmacopoeial Convention, Inc.: Rockville, MD, 2000; 1773—1774.
2. British Pharmacopoeia (BP) 2001; British Pharmacopoeia Commission: London, UK, 2001; 1810.
3. European Pharmacopoeia, 4th Ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2002; 561.
4. Specifications; Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances. International Conference on Harmonization (ICH), Geneva, Switzerland, October 1999.
5. Gennaro, A. R. (Editor-in-Chief), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins: PA/MD, 2000; 883.
6. Gibaldi, M. Biopharmaceutic and Clinical Pharmacokinetics, 4th Ed.; Lea/Febiger: Philadelphia/London, 1991.

7. Abdou, H. M. Dissolution, Bioavailability and Bioequivalence, Mack Publishing Company; Easton, PA, 1989.
8. United States Food and Drug Administration Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products—General Consideration, October 2000.
9. United States Food and Drug Administration Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, May 2001.
10. Dressman, J. B.; Reppas, C. In Vitro-In Vivo Correlations for Lipophilic, Poorly Water-Soluble Drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000, 11, (S-73) — (S-80) .
11. Nichlaides, E.; Galia, E.; Efthymiopoulos, C.; Dressman, J. B.; Reppas, C. Forecasting the In Vivo Performance of Four Low Solubility Drugs from Their In Vitro Dissolution Data. *Pharm. Res.* 1999, 16, 1876—1882.
12. USP XXIV; The United States Pharmacopoeial Convention, Inc.; Rockville, MD, 2000; 1941—1951.
13. Qureshi, S. A.; McGilveray, I. J. Typical Variability in Drug Dissolution Testing: Study with USP and FDA Calibrator Tablets and a Marketed Drug (Glibenclamide) Product. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1999, 7, 249—258.
14. Qureshi, S. A.; Shabnam, J. Cause of High Variability in Drug Dissolution Testing and Its Impact on Setting Tolerance. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001, 12, 271—276.
15. USP XXIV; The United States Pharmacopoeial Convention, Inc.; Rockville, MD, 2000; 1943.
16. Shah, V. P.; Tsong, Y.; Sathe, P.; Liu, J.-p In Vitro Dissolution Profile Comparison, Statistics and Analysis of the Similarity Factor, f_2 . *Pharm. Res.* 1998, 15, 889—896.
17. Augsburger, L.; Shangraw, R.; Lesko, L. J.; Williams, R. An Approach Towards Establishing a Scientific Foundation for Interpreting Regulations and Workshop Reports of Scale-Up and Postapproval Changes. *Pharm. Res.* 1994, 11, S-143.
18. Eddington, N. D.; Ashraf, M.; Augsburger, L. L.; Leslie, J. L.; Fossler, M. J.; Lesko, L. J.; Shah, V. P.; Rekhi, G. S. Identification of Formulation and Manufacturing Variables That Influence In Vitro Dissolution and In Vivo Bioavailability of Propranolol Hydrochloride Tablets. *Pharm. Dev. Tech.* 1998, 3, 535—547.
19. Gillespie, W. R. Convolution-Based Approaches for In Vivo—In Vitro Correlation Modeling. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997, 423, 53—65.
20. Polli, J. E. Dependence of In Vitro—In Vivo Correlation Analysis Acceptability on Model Selections. *Pharm. Dev. Tech.* 1999, 4, 89—96.
21. Dowell, J. A.; Hussain, A.; Devane, J.; Young, D. Artificial Neural Network Applied to the In Vitro—In Vivo Correlation of an Extended-Release Formulation: Initial Trials and Experience. *J. Pharm. Sci.* 1999, 88, 154—160.
22. Eddington, N. D.; Marroum, P.; Uppoor, R.; Hussain, A.; Augsburger, L. Development and Internal Validation of an In Vitro—In Vivo Correlation for a Hydrophilic Metoprolol Tartrate Extended Release Tablet Formulation. *Pharm. Res.* 1998, 5, 466—473.
23. Langenbucher, F.; IVIVC: Indices for Comparing Release and Response Profiles. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 1999, 25, 1223—1225.
24. Meyer, M. C.; Straughn, A. B.; Mhatre, R. M.; Shah, V. P.; Williams, R. L.; Lesko, L. J. Lack of In Vitro/In Vivo Correlations of 50 mg and 250 mg Primidone Tablets. *Pharm. Res.* 1998, 15, 1085—1089.
25. Amidon, G. L.; Lennernas, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R. A Theoretical Basis for the Biopharmaceutical Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability. *Pharm. Res.* 1995, 12, 413—420.
26. FDA Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, August 2000.
27. Harmonized Tripartite Guidelines: Stability Testing of New Drug Substances and Products. International Conference on Harmonization (ICH), Geneva, Switzerland, November 2000.

(袁 渊 译)

P

片剂的生产

Norman Anthony Armstrong

Cardiff University, Cardiff, United Kingdom

引言

压制片显然是应用最广泛的剂型,无论对生产者还是使用者均有优势。片剂的生产过程则可能比较复杂,其原因在于仅有少数原材料本身具备生产优良片剂所必需的性质,因而常需进行某些必要的预处理或在处方中加入辅料。片剂的生产过程又是自相矛盾的,它要求处方专家运用相当多的聪明才智将一堆粒子变成低孔隙率的块状物。在吞服片剂后,通常又转而要求片剂尽可能快地释放出活性成分,要达到这一目的需要花费更多的心思。

片剂属于固体制剂,每一片都含有单剂量的一种或多种活性成分,由一定体积的粒子压缩制成,绝大多数情况下采取口服给药途径。

类似片剂的剂型始载于 10 世纪时的阿拉伯医药文献。药物粒子被置于经雕刻的乌木末端之间,然后通过铁锤施加压力。1843 年,William Brockedon 因“利用压力使冲模中的颗粒或粉末状原料成型并固化而生产药丸和含片”被授予英国专利(专利号 9977),这是迄今已知最早公布的关于压片过程的详细记载。其压力也同样来源于铁锤。第一个应用该方法的药物是碳酸氢钾。

当时称为压制药丸的使用迅速增多。首次将该剂型命名为“片剂”似乎是在 19 世纪 70 年代的美国。随后电力驱动的压制设备取代了 Brockedon 的铁锤,至 1874 年时旋转和偏轴压片设备均已出现,二者的运转方式与现代所用的设备基本相似。与生产较为传统的丸剂等固体制剂的缓慢的劳动密集型方式相反,片剂通过机械手段实现了大规模生产。单个药剂师制备少量片剂是无法达到商业规模的,因而药品生产都集中在少数几个工业区内。

1885 年英国药典收录了硝酸甘油片专论,但直至 1945 年以前都没有增加新的片剂品种。这并非是因为该剂型本身不受欢迎,而是由于缺乏适用于片剂的合理的质量控制方法。

然而片剂并没有获得广泛的认同。1865 年英国药剂学杂志的一位编辑将片剂描述为“合法药房所遭遇的不幸之一”,并预言片剂已“末日来临”^[1]。但这一预言未能应验,片剂的应用反而持续增加。至第 2000 版英国药典已收录了 320 个片剂专论,远远超过了其他剂型。

片剂之所以成为最受欢迎的剂型是由于它具有药品生产者和消费者所关注的种种优点。尽管片剂生产商在初期需要投入大量资金,但他们能够以高于任何其他剂型的速度生产片剂,现有的压片设备生产能力可达每小时 1 百万片。此外,片剂作为干燥的剂型具有较好的稳定性,总体

来说其储存期可以年度计算。由于所含的辅料比例相对口服液体等较小,片剂还非常便于批量运输。

从药剂师的观点来看,片剂易于分发,因为患者将获得一个浓缩的便于携带和服用的剂型。此外,只要制法合理,片剂剂量的均一性远远高于其他多数药品,通过适当的包衣还能掩盖不良气味并提高患者的依从性。

片剂还是一个多功能的药物递释系统。尽管多数片剂需要整片吞服,相同的基本生产工艺以及相似的处方还可以用于舌下、颊腔、直肠和阴道给药的片剂,以及錠剂、可溶片、分散片、泡腾片。此外,尚有多种技术可以延缓或调整片剂中活性成分的释放行为。

若处方和工艺合理,片剂本身即具有以上优势。优良的片剂应具备以下特性:

(1) 应含有标示量的药物,且含量在允许的限度内。

(2) 应具有足够的强度以承受生产、运输和携带过程中的压力,以便完整地送达到患者。

(3) 应在给定部位以所需速率释放一定剂量的药物。

(4) 其大小、口味和外观不应影响患者的依从性。

片剂的压制

所有片剂都经由压制过程制得。将较小的固体粒子填入冲模中,再由冲头施以数吨的压力。冲模的形状决定了片剂的横截面形状,而厚度取决于最大压力时冲头之间的距离。片剂表面的构造与冲头的构造相对应,通常是平面或凸起的球面。

下冲冲头在冲模内上下活动但不会离开冲模。上冲下降进入冲模并施加压力,然后退出以便片子随着下冲的上升运动而弹出。

现有两种压片机:偏轴压片机具有一个冲模和一对冲头;旋转压片机的旋转架内有大量的冲模以及与之相适应的冲头。

不论是何种压片设备,片剂的压制过程可以分为图 1 所示的三个步骤。

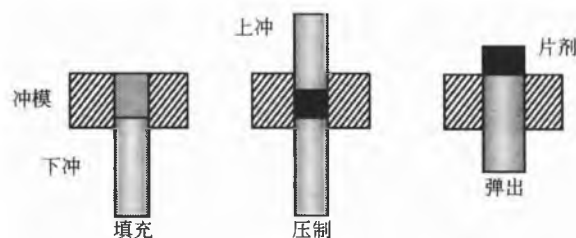


图 1 偏轴压片机的操作流程



1. 步骤一：填充

下冲在冲模内下降留出一个孔穴，料斗内的颗粒在重力作用下流入其中。虽然常用重量描述片剂，但实际上冲模的充填是一个定容的过程。容积取决于下冲在冲模下降的深度。除非每一次都重复填满一定的容积，否则片重将产生变化，随之改变的是每片的含药量。因此，填料的一致性很关键。然而必须牢记这一点，即冲模孔穴的横截面直径仅有几毫米，每充填一个冲模只有不到 1s 的时间。这就要求粒子必须具有良好的、均一的流动性。

2. 步骤二：压制

上冲下降，冲头进入冲模并挤压其中的颗粒。上冲单独移动（偏轴压片机）或是上下冲同时移动（旋转压片机）均能缩短冲头间距。冲模内填充物的孔隙逐渐减少，颗粒在压力作用下不断互相接近。颗粒的碎裂和变形促进了这一过程。一旦颗粒相距足够近，粒子间的作用力就使得单个粒子开始聚集并形成片剂。作用力的大小取决于两冲头之间的最小间距。因此，粒子应具备的第二个重要性质就是它们能够在压力的作用下产生黏合。当移去压力后仍然要维持这种黏合状态，这一点也是很重要的。

3. 步骤三：出片

上冲退出冲模的同时也移去了原本施加在片剂上的压力。这一动作可能使得已变形的颗粒恢复原形，进而导致粒子间的紧密度以及片剂的强度下降。因此必须要确保以上情况不会发生。随着上冲离开冲模，下冲上升并将其上的片剂推出。在压片期间，粒子被迫与冲模内壁紧密接触。因而出片过程将受到摩擦力的影响，需要减低片剂与模壁之间的黏附才能保证顺利出片。

综上所述，若要将固体颗粒成功地制成片剂，它必须具备三个关键性质：

- (1) 流动性良好。
 - (2) 在压力的作用下粒子应能黏合，且在移去压力后能维持黏合状态。
 - (3) 移去压力后应能从冲模中顺利推出片剂。
- 很少有哪种粉末同时具备以上特性，有些粉末甚至一条也不符合。因此，若要顺利进行制片，几乎不可避免地需要事先加入一种或多种辅料进行一定的预处理。

生产片剂的方法

预处理过程常采用制粒的方式。制粒过程本质上是粒径的增加，应用在片剂生产工艺中可以达到以下目的：

- (1) 较大的粒子比较小者更易于流动，因此增大粒径可以提高流动性。
- (2) 可以改善压缩性，增强片剂黏合力。
- (3) 相互黏合的粒子之间难于分离，因此一旦混合均

匀后就可以防止分层。

(4) 减少粉尘。

可以选用湿法制粒和干法制粒技术。

1. 湿法制粒压片法

这是固体粉末压片前进行预处理的传统方法。尽管该法较为复杂且自身存在某些缺陷，但至今世界上仍有约半数的片剂产品采用该工艺。其本质是活性组分粒子（必要时加入稀释剂）利用黏合剂黏合在一起，其中黏合剂多以水溶液为主。最终获得的颗粒状产品在压片时具有良好的流动性和黏合性。

湿法制粒工艺及所用辅料的流程图见图 2。

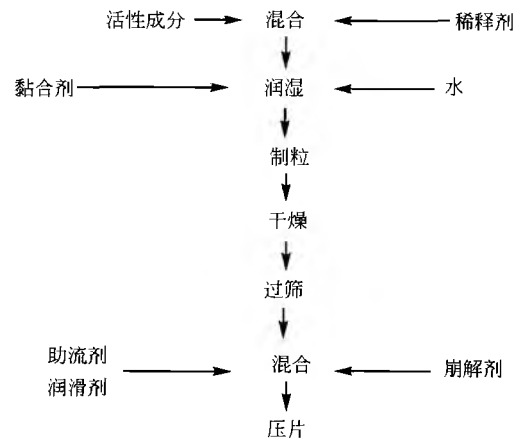


图 2 片剂生产的湿法制粒工艺

1.1 稀释剂

湿法制粒工艺的第一步通常是将活性成分与某种稀释剂进行干法混合。许多药物的给药剂量仅有几微克甚至更低，但片重小于 50mg 的片剂不便于患者使用，此时有必要通过加入稀释剂增加片重。表 1 列举了一些常用的稀释剂。

表 1 片剂稀释剂

稀释剂	性质
碳酸钙	不溶于水（Cal-Carb [®] ，Millicarb [®] ，Pharma-Carb [®] ，Sturcal [®] ）
磷酸氢钙	不溶于水，流动性好，有二水合物和无水物（Cyfos [®] ，Calstar [®] ，Calipharm [®] ，Emcompress [®] ）
磷酸钙	不溶于水（Tricafos [®] ，Tri-Cal [®] ，Tri-Tab [®] ）
硫酸钙	不溶于水（Cal-Tab [®] ，Compactrol [®] ）
微晶纤维素	可压性好，无需再加润滑剂，可作为崩解剂（Avicel [®] ，Emcocel [®] ，Vivacel [®] ）
微粉硅胶微晶纤维素	微晶纤维素和硅胶的复合物（Prosolv [®] ）

续表

稀释剂	性质
粉末纤维素	(Elcema [®] , Solka-Floc [®])
葡萄糖结合剂	(Emdex [®])
葡萄糖	具吸湿性, 减少食糖用量 (Tabfine [®])
果糖	(Fructofin [®])
乳糖醇	(Finlac [®])
一水合乳糖	最常用的稀释剂。价廉, 可参与 Maillard 反应 (Fast-Flo [®] , Lactochem [®] , Microtose [®] , Pharmatose [®] , Tablettose [®] , Zep- arox [®])
碳酸镁	
麦芽糖醇	(Maltisorb [®] , Maltit [®])
麦芽	(Glycidex [®] , Lycatab [®] , Maltrin [®])
麦芽糖	(Advantose [®])
甘露醇	易溶于水, 溶解时吸热而产生清凉口感, 常用于咀嚼片, 无热量 (Pearlitol [®])
氯化钠	易溶于水, 用于可溶性片剂
山梨醇	
淀粉	也可作为崩解剂, 生产的片剂可能较软
预胶化淀粉	也可作为崩解剂 (Lycatab [®] , Pharma-Gel [®] , Pre-Jel [®] , Sepistab [®] , Starch 1500 [®] , Starx 1500 [®])
蔗糖	易溶于水, 味甜, 具吸湿性, 用于生产含片时常与乳糖合用
可压性蔗糖	(Dipac [®] , Nutab [®])
蔗糖粉	
蔗糖球形颗粒	(Nu-Core [®] , Nu-Pareil [®])
滑石粉	
木糖醇	溶解时吸热而产生清凉口感 (Xylifin [®] , Xylitab [®])

注: 圆括号内给出辅料的商品名。

理想的稀释剂应具有良好的理化稳定性, 不影响活性成分的生物利用度。当活性成分比例很小时, 混合物的可压性主要取决于所用的稀释剂, 因此理想的稀释剂还应价格便宜、易于压片。

乳糖是固体剂型最常用的稀释剂。它属于二糖, 是乳糖工业的副产品, 有几种类型可供选用, 其中 α -乳糖一水合物常作为湿法制粒压片中的稀释剂。乳糖能自由而缓慢地溶于水, 因此作为稀释剂也适用于低水溶性的

活性成分。作为非还原糖类, 乳糖具有相当的稳定性。当与含有伯胺基团的物质混合时, 乳糖可参与发生 Maillard 反应, 并得到深色产物, 因此不宜用于这类处方^[2]。

湿法制粒工艺中第二种常用的稀释剂大概算是磷酸氢钙。这种物质实质上不溶于水, 因此需要加入崩解剂。其特性可见 Carstensen 和 Ertell 的综述^[3]。

1.2 混合

混合工序的目的是确保粉末混匀而使制得的片剂含量均匀。随机混合物是指所取样品中所含某种类型粒子的概率与这种粒子在整个混合物中的数目成正比的混合物。因此, 混合的目的是取样后, 样品中各组分的相对比例与整个混合物是一致的。

液体内的分子会自发地依照扩散机制混合, 但粉末粒子不会自发混合而是保持各自的相对位置。因此必须向系统施加能量才能发生混合。这就造成粉床扩大或膨胀, 粒子相互分离进而产生粒子间的相对运动。

人们的直觉认为混合物的随机性可能会随着时间推移而逐渐升高, 但事实并非总是如此。在一定条件下存在着最佳混合时间, 超过这个时间则混合物趋向于分离并恢复到原先的状态, 这个过程被称为离析。当混合物所含粒子大小悬殊时尤其容易发生离析, 其次是形状和密度差异的影响。在混合设备中产生规律性的运动时, 特别容易发生离析, 基于这个原因, 混合器都被设计进行不规则混合运动^[4]。

虽然一般情况下组分之间的粒径差异可能导致发生离析, 但粒径大小差异很大的情况下也可能会有利于混合。此时, 小粒子被大粒子的不规则表面所捕集。在此过程中两组分的粒子无法独立运动, 因此不属于随机混合, 而称之为“有序混合”, 适用于生产含有少量强活性成分的固体剂型^[5]。

1.3 制粒

湿法制粒中粒子增大的基本过程是通过以下不同机理中的一种或两种实现的。首先, 相邻的固体粒子可利用黏性物质黏结在一起, 这些物质被称为黏合剂或成粒剂。其次, 会发生固体溶解于成粒剂溶液中, 接着后者的溶剂蒸发, 导致已溶解物沉积在粒子表面而形成所谓的晶体桥。该机理的发生取决于固体在溶液相中的溶解度。因而, 蔗糖与成粒剂的水溶液将会形成晶体桥, 而磷酸钙则不能。

Sherrington 和 Oliver^[6]已详细描述了制粒工艺和成粒机制。表 2 提供了常用黏合剂的详细资料。它们多数是天然或合成的聚合物, 常以水溶液或水分散体的形式应用。另外, 它们也可以在干燥状态下与处方中的其他固体混合后再加水制粒。

表 2 湿法制粒过程中选用的黏合剂

黏合剂	溶液浓度 (w/v)/%	备注
阿拉伯树胶液	最大可达 20	所制的颗粒硬度很高
褐藻酸	1~5	
卡波姆	5~10	(Carbopol®)
羧甲基纤维素钙	5~15	(Nymcel®)
羧甲基纤维素钠	5~15	(Nymcel®)
纤维素, 微晶纤维素		(Avicel®, Emcocel®, Vivacel®)
粉末纤维素		(Elcema®, Solka Floc®)
乙基纤维素	1~3	(Aquacoat®)
明胶	5~20	在冷水中能形成凝胶, 因此需要应用温热的溶液; 黏合力强
葡萄糖, 液体	最大可达 50	黏合性强, 具吸湿性
瓜尔胶	1~10	
羟甲基纤维素	2~6	(Cellosize®)
羟丙基纤维素	2~6	(Klucel®, Methocel®)
低取代羟丙基纤维素	5~25	
羟丙基甲基纤维素	2~5	(Methocel®, Pharmacoat®)
硅酸镁铝	2~10	(Pharmasorb®, Veegum®)
麦芽糖	2~10	(Glucidex®, Lycatab®, Maltrin®)
甲基纤维素	1~5	(Celacol®, Methocel®)
聚葡萄糖		(Litesse®)
聚氧乙烯	5	(Polyox®)
聚维酮	0.5~5	又称为 PVP 或聚乙烯吡咯烷酮。溶于水 and 某些有机溶剂, 可用于非水溶剂制粒, 极常用, 为合成材料 (Kollidon®, Plasdone®)
海藻酸钠	1~3	(Manucol®)
淀粉浆	5~25	极常用
预胶化淀粉	5~10	(Lycatab®, Pharma-Gel®, Pre-Jel®, Sepistab®, Starch 1500®, Starx 1500®)
蔗糖 (糖浆)	最大可达 70	具吸湿性, 所制片剂的硬度在储存期内可能增大
水		适于易溶于水的固体

注: 圆括号内给出辅料的商品名。

当水分存在时若活性成分不稳定, 那么制粒工序中可以采用非水溶液。此时常采用聚维酮的异丙醇溶液作为成粒系统。采用挥发性和可燃性溶剂所带来的高额成本和环境问题阻碍了非水制粒方法的应用。

剪切制粒机属于传统的制粒设备, 它能够将黏合剂和淀粉浆类的黏性液体与大量干粉均匀地混合成为团块, 常需施加较大的剪切力。将待混匀的固体装入搅拌机的料槽内, 边搅拌边加入液体。随后, 润湿的固体被加压通过一个相对较粗糙的筛网 (孔径为 1~2mm) 而形成松散的颗粒, 通常是借助振荡杆的压力。可以通过测定制粒机的耗电量对制粒工序的进度进行监控, 从而确定最佳的制粒时

间。Ertell 等^[7]已证实制粒机大小和混合时间长短对最终片剂产品的物理性质和溶出速率有很大影响。

如上所述, 湿法制粒过程是一个耗时长而成本高的工序, 但可以通过引入高速混合制粒机加以改进。这种设备具有搅拌桨和切削刀, 实现了在单一设备中同时进行混合、制软材和制粒。采用这种设备时制粒过程进行得极快, 因此确定最佳制粒时间也就更加重要。

更为先进的技术当数流化床制粒。空气从底部穿过粉床, 使得粉末粒子悬浮于气流中而进行高效混合。接着成粒剂溶液喷在粒子上, 在碰撞时发生黏结, 形成的颗粒在热气流作用下被干燥。

Kristensen 和 Schaefer^[8]详细回顾了湿法制粒的工序和设备及其在药剂学中的应用。

1.4 干燥

制粒工序得到湿颗粒,但水分的存在会降低其流动性,甚至可能导致化学不稳定性,因此必须除去所含的液体。通常采用蒸发手段除去水分,这就需要消耗能量。尽管微波能量越来越多地应用于片剂生产的干燥过程中,但多数情况下仍以热能的形式提供干燥颗粒所需的能量。

高效干燥设备应由以下几个主要部分构成:用于提高温度、降低相对湿度的加热器;用于除去水蒸气的装置,以便缩短水分子在蒸发前所需经过的扩散距离。

流化床干燥机是干燥片剂颗粒的最常用设备。从底部喷入热空气使固体粒子呈流态化,以便粒子相互分离。热空气为热交换提供了良好的载体,同时也能有效地除去水蒸气。干燥速率取决于水分子在到达蒸发表面前的扩散路径长短。由于每个湿颗粒都是一个独立单元,水分子扩散的最大距离与粒子半径相等,因此流化床干燥速率很快。

流化床的温度可以精确控制,并最终得到能自由流动的产品。流化床制粒与之相似,该设备根据流化床原理设计,在一个容器内可同时进行混合、制粒、干燥操作。

尽管气流的紊乱可能导致粒子间的碰撞并因此产生磨损,但通常都不太严重。然而,粒子在干热环境内的激烈运动可能会发生静电释放。因此必须采取适当的预防措施,当制粒过程中使用了易燃液体时尤需注意。

最传统的干燥方法是采用烘箱。热气流穿过一系列放置湿颗粒的搁板。与流化床干燥机相比,烘箱内的气固界面面积较小,水分子在到达蒸发表面之前需要扩散经过整个固体物料层的厚度。料层越薄则蒸发越快,但同时会降低干燥器的整体容量。因此,烘箱内的干燥过程慢于流化床干燥机。

当水分扩散通过物料层时,将携带处方中可溶于水的组分,导致这些组分在物料中的不均匀分布。这个问题在流化床干燥过程中不严重,但在烘箱干燥过程中料层上下表面的组分则可能存在显著差异。从而致使药物含量不均匀。若发生迁移的是有色组分,则产品的外观会产生差异^[9,10]。

微波干燥在制药工业中的应用日益广泛。产生的微波辐射(所用频率为 2450MHz 和 960MHz)使物质如水分子中的电子发生共振,进而释放热能并使水分蒸发,并在真空下除去水蒸气。因此产品在相对较低的温度下迅速被干燥。由于料床固定,不会发生粒子磨损,生成的粉尘也减至最少(参见本书“干燥与干燥设备”一章)。

1.5 二次混合

经过干燥后,尤其是经过烘箱干燥后的产品会黏结

成为相对较大的团块。然后将干燥后的物料通过筛网(通常 250~700 μm),将聚合团块分散成为粒径较均匀的颗粒。加入处方中的几种重要组分后,需要进行二次混合。

1.6 助流剂

从最初的粉末到颗粒的形成,粒子的流动性可能已经得到了很大改善,并足以产生均一的冲模填充量。但若其流动性仍达不到要求,则可加入助流剂(也称为抗黏剂)进一步改善其流动性。

最常用的助流剂当数胶体二氧化硅,其平均粒径约为 20nm。它黏附在不规则颗粒的表面并使其构造更为圆整,进而降低了粒子间的摩擦力。其另一个优势是作为除湿剂。处方中残余的水分与硅酸结合,进而为其他组分提供了一个更为干燥的环境。

Augsburger 和 Shangraw^[11]回顾了评价助流剂作用的方法。Lerk 等^[12]的研究表明片剂处方中含有 0.2% 的硅胶时对片剂破碎强度没有影响。但超过此限度会降低其破碎强度,尤其是在延长混合时间的情况下。

表 3 列举了一些常用的助流剂。

表 3 常用的片剂助流剂

助流剂	在片剂中的用量/%	内容
硅酸钙	0.5~2	(Elcema®, Solka Floc®)
粉末纤维素	1~2	
碳酸镁	1~3	
氧化镁	1~3	
硅酸镁	0.5~2	
胶体二氧化硅	0.05~0.5	优良的助流剂 (Aerosil®, Cab-o-Sil®)
淀粉	2~10	
滑石粉	1~10	不溶于水但并非疏水性

注:圆括号内给出辅料的商品名。

1.7 润滑剂

压片过程中,片剂侧面被迫紧贴着冲模内壁,其后片子必须被推出模外,这涉及片剂侧面相对于冲模内壁的运动,因此需要克服片剂与冲模之间的摩擦力。当含有乳糖等物质时,摩擦阻力可能会很强,很难从冲模中毫无损伤地移出片子或者很难进行压片。因此,片剂处方中几乎少不了要添加润滑剂。当界面处发生剪切时,润滑剂易于变形,因此它存在于片和冲模内壁之间并形成一层易于变形的薄膜^[13]。

表 4 中描述了一些片剂润滑剂的特点。

表4 片剂润滑剂

润滑剂	在片剂中的用量/%	内容
硬脂酸钙	0.5~2	不溶于水
富马酸	5	可溶于水
山萘酸甘油酯	0.5~4	不溶于水
硬脂酸棕榈酸甘油酯	0.5~5.0	不溶于水 (Precirol®)
氢化植物油	1~6	不溶于水, 可与滑石粉合用 (Lubritab®, Sterotex®)
十二烷基硫酸镁	1~2	溶于热水
硬脂酸镁	0.25~5	不溶于水, 为优良润滑剂, 降低片张力, 延长崩解和溶出时间
聚乙二醇 4000 或 6000	2~5	可溶于水, 性能适中, 又称为 macrogols (Carbowax®)
十二烷基硫酸钠	1~2	可溶于水, 润滑性能适中, 但可润湿性良好, 常与硬脂酸类合用 (Empicol®, Stearowet C®)
硬脂酰富马酸钠	0.5~2.0	微溶于冷水, 溶于热水 (Pruv®)
淀粉	2~10	润滑性适中
硬脂酸	1~3	不溶于水
滑石粉	1~10	不溶于水但非疏水性, 润滑性适中
硬脂酸锌	0.5~2	不溶于水

注: 圆括号内给出辅料的商品名。

润滑不足通常表现为片剂侧面的垂直擦痕, 还可能导致固体物料黏附在冲头表面, 进而在片子表面形成纹理或凹窝状的外观, 这一现象称为黏冲。

实际上硬脂酸镁是应用最广泛且极为有效的片剂润滑剂。与其他脂肪酸的金属盐相同, 硬脂酸镁的作用被认为是源于能将分子的极性金属部分与粉末粒子表面结合, 其结果是分子的烃基部分从表面伸出^[14], 进而形成非极性层并朝向相邻粉末粒子和压片设备。硬脂酸镁用于片剂的优缺点均基于该非极性层的形成。

若要在片剂制备过程中发挥有效的润滑作用, 润滑剂必须分布在粉末粒子或颗粒的表面, 所形成的粉层越连续完整, 润滑作用就越强。但也产生了两个负面影响: 一是各粉末粒子呈疏水性而排斥水分外表面。众所周知, 脂肪酸类的润滑剂会延缓崩解和溶出, 并会导致生物利用度方面的问题。二是粉末粒子之间的直接接触至少有一部分被相邻的烃基层所代替。由于这些烃基层的剪切力较低, 必将会导致粒子间结合力降低进而削弱片剂的结构。当处方中含有微晶纤维素这类在压力下产生形变的物质时, 片剂强度的减弱尤其明显, 因为尽管粒子能改变形状, 但烃基层保持不变。而那些在压力下碎裂的物质则仅有较小幅度的强度降低, 因为粒子破裂时所形成的新表面未沾上润滑剂。这些新的表面进一步参与粒子间的结合^[15]。

以上所有影响因素, 包括正面和负面的, 都是润滑剂粒子摩擦及其在片剂其他组分外表面分散的结果。因此, 任何能影响润滑剂摩擦或成膜完整性的工艺因素均有可能影响片剂的崩解、溶出、生物利用度和物理强度。其中混

合工艺尤其重要, 混合时间、混合设备类型和批量大小均能影响片剂性能^[16]。因此需要确定最小润滑剂用量, 并优化混合时间以获取适宜的润滑效果而不会对片剂产品的特性产生不利影响。为保证批次间的一致性, 混合工艺的参数如混合器类型、批量大小和混合时间等必须尽可能保持不变。通常混合 2~5min 即可产生足够的润滑效果^[17]。

烃类润滑剂的疏水性可以通过向处方中加入十二烷基硫酸钠等润湿剂得到一定程度的改善。这些物质本身也具有一定的润滑作用。硬脂酸盐类和十二烷基硫酸盐类的混合物已有商品供应。

硬脂酰富马酸钠作为硬脂酸镁的替代品已有应用。其润滑效果几乎相当, 也具有类似的降低片剂强度和延长崩解时间的作用^[18]。

由于脂肪酸类润滑剂的溶解性差, 不适用于给药前必须先溶解的片剂。聚乙二醇 6000 (macrogol 6000) 可溶于水, 但其润滑性有限。十二烷基硫酸镁被推荐作为替代硬脂酸镁的水溶性物质。除了具有润滑作用之外, 它同十二烷基硫酸钠一样也是一种优良的润湿剂^[19]。

需要强调的是在片剂处方中助流剂和润滑剂的作用是截然不同的。少数物质如滑石粉等能同时用作助流剂和润滑剂。而尽管胶体二氧化硅是一种优良的助流剂, 却不具有润滑性。硬脂酸镁则相反, 尽管作为润滑剂广受欢迎, 却会阻滞而非促进粒子的流动。

1.8 崩解剂

生产优良片剂的关键是粒子相互间牢固地黏合, 以使

片剂具有高度的物理强度和低孔隙率。但在被胃肠道吸收之前,活性成分必须首先溶出,而过硬的片剂会阻碍药物的溶出。因此,片剂处方通常含有某种崩解剂,以便在与水接触后瓦解片剂结构并使之破碎。如此会使更大的表面

积暴露在溶出介质中,而有利于溶出过程。当片剂所含易溶于水的固体占很大比例时,崩解剂并非必要,因为这类片剂的外表面更趋向于溶蚀而非崩解。

一些片剂崩解剂的细节参见表 5。

表 5 片剂崩解剂

崩解剂	在片剂中的用量/% (w/w)	内容
褐藻酸	2~10	
二氧化碳		由泡腾片在体内产生
羧甲基纤维素钙	1~15	(Nymcel®)
羧甲基纤维素钠	1~5	(Nymcel®)
微晶纤维素	最高可达 10	可用于直接压片,具有一定的润滑性能 (Avicel®, Emcocel®, Vivacel®)
粉末纤维素	5~15	(Solka Floc®)
交联羧甲基纤维素钠	0.5~5	(Ac-di-Sol®, Solutab®)
交联聚维酮	2~5	(Kollidon CL®, Polyplasdone XL®)
多库酯钠	0.5~1	主要作为润湿剂
瓜尔胶	2~8	
低取代羟丙甲纤维素	5~25	
硅酸镁铝	2~10	(Veegum®)
甲基纤维素	2~10	
波拉克林钾	2~10	阳离子交换树脂 (Amberlite IRP88®)
泊洛沙姆	5~10	
聚维酮	0.5~5	(Kollidon®, Plasdone®)
海藻酸钠	2.5~10	(Manurol®)
甘氨酸钠碳酸盐		泡腾片产生二氧化碳的来源
十二烷基硫酸钠	0.5~2	主要作为润湿剂,但可辅助崩解 (Empicol®)
羧甲基淀粉钠	2~8	(Explotab®, Primojel®)
淀粉	2~10	最常用的是马铃薯和玉米淀粉
预胶化淀粉	5~10	(Lycatab®, Pharma-Gel®, Pre-Jel®, Sepistab®, Starch 1500®, Starx 1500®)

注:圆括号内给出辅料的商品名。

多年来淀粉一直是首选的崩解剂。但近期则引入了一些能够显著缩短片剂崩解时间的所谓“超级崩解剂”。这些物质包括交联羧甲基纤维素、交联聚维酮、波拉克林钾和羧甲基淀粉钠等^[20]。

崩解剂可以在使用制粒溶液润湿之前先与其他粉末混合(粒子内),或在二次混合期间加入(粒子间)或同时加入。Shotton 和 Leonard 发现粒子间崩解剂能使片剂更快地崩解,而粒子内崩解剂能够崩解片剂和随后产生的颗粒而产生更细的粒子^[21]。

崩解剂的作用机理一度曾引起争议^[22]。淀粉等物质遇水膨胀致使片剂结构发生破坏。而其他有效的崩解剂并不发生类似的膨胀,其作用机理被认为是形成网状的亲水通路以利于水分经由该路径扩散进入片剂内。不管是遵循哪一种崩解机制,片剂的吸水无疑是崩解过程的第一步^[23]。

加入十二烷基硫酸钠或多库酯钠等润湿剂能够降低表面张力,利于水分的渗透,常与硬脂酸镁等疏水性润滑剂联合应用。

2. 干法制粒压片法

尽管湿法制粒工艺在片剂生产中应用广泛,但仍存在某些缺点。常用水作为制粒溶剂,使得片剂组分有可能发生水解。而且必须除去制粒溶剂,通常是采取加热的手段。除了所需的能源成本以外,温度的升高也会加速可能产生的任何水解反应。

干法制粒是可供选用的替代方法,其工艺流程见图 3。处方的组分在干燥状态下被压制成型。如果仅由加压无法获得足够的黏合强度,同样可以加入干燥的黏合剂。

预压可以采用以下两种方法之一:第一种是采用传统

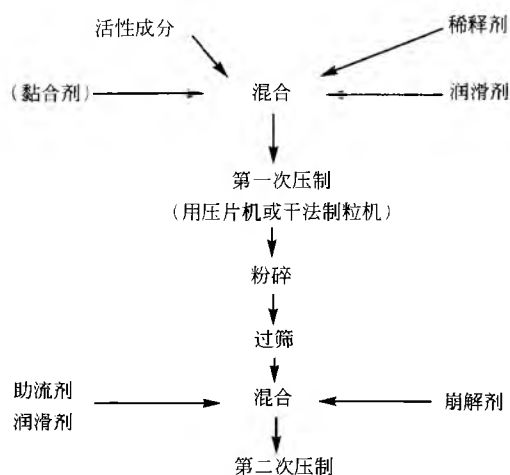


图3 片剂生产的干法制粒工艺流程

压片法，其工艺通常称为“预压”。由于处方成分不具备生产优良片剂所必需的特性，该工艺（预压）制得的片剂不具备合乎要求的质量，尤其是在外观和片重均一性两方面。接着预压片被粉碎成颗粒状，过筛后经过再一次压制可以得到合格的片剂。Malkowska 和 Khan 证实二次压片时处方的可压性与预压过程施加的压力呈反比，提示应避免在重压下进行预压^[24]。第二种方法是采用辊压机。粉末混合物在两个相对转动的圆柱形辊轴之间通过，形成薄饼状，然后粉碎成颗粒并再次压片。两种方法均需要在首次压制前加入润滑剂，而二次压制时可能需要更多的润滑剂。

3. 直接压片法生产片剂

显然湿法和干法制粒压片均为复杂的多步工艺，但对于将处方中的组分转变为易于压制成人满意片剂的这两种方法来说则是必要的。但若处方中的主要组分已具备了所需的流动性和可压性，则不必进行制粒。这是采用直接压片法生产片剂的前提^[25]。

此处的关键组分即指稀释剂。它不仅要具备合理的片剂处方所必需的特性，还要在与处方中的其他组分如活性成分混合后仍然保持这些特性。

直接压片的流程见图4。组分被混合后进行压片。润滑剂几乎是必不可少的组分，必要时还可加入助流剂和崩解剂。该工艺无需加入液体，从而避免了干燥步骤及其附加的能源消耗。

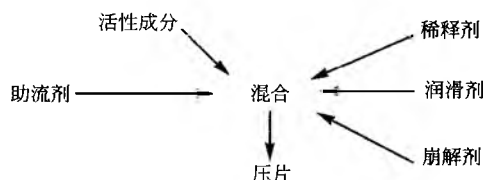


图4 片剂生产的直接压片工艺流程

表6列出了一部分直接压片用稀释剂的细节。其中绝大部分仅有一家供应商，但其中最常用的两种——喷雾干

燥乳糖和微晶纤维素则有数家。

表6 一部分直接压片用稀释剂

稀释剂	生产商	内容
磷酸氢钙	Emcompress®, Di-Tab®	流动性好，密度高，不溶于水
磷酸钙	Di-Tab®	不溶于水
硫酸钙	Compactrol®	不溶于水
微晶纤维素	Avicel®, Emcocel®, Vivacel®	具有高度可压性，堆密度低，可作为崩解剂
粉末纤维素	Elcema®	
葡萄糖结合剂	Emdex®	
乳糖醇	Finlac® DC	
乳糖		具有良好的流动性
无水 α 型	Pharmatose DCL30®	
无水 β 型	Pharmatose DCL21®	
喷雾干燥	Fast-Flo®, Zeparox®, Pharmatose DCL11®	
乳糖-纤维素预混合物	Cellactose®	
麦芽糊精	Lycatab®, Maltrin®	可溶于水，微有润滑作用
甘露醇	Pearlitol®	易溶于水，溶解时吸热
山梨醇	Neosorb®	
预胶化淀粉	Starch 1500®, Starx 1500®	具崩解作用
蔗糖-麦芽糊精共沉淀物	Des-Tab®, Dipac®, Nu-Tab®	流动性良好，对湿敏感
木糖醇	Xylitab®	易溶于水，溶解时吸热

考虑到这种片剂生产方法显而易见的简易以及可供选用的适宜稀释剂商品的数量众多，包括制粒在内的片剂生产技术仍然得到如此广泛的应用可能让人感到吃惊。当然，直接压片法只用于处方仅需一种稀释剂的情况，即活性成分必须具有较强的效力。直接压片可以大幅节约能源、设备和物料的操作损耗。但必须设置较高的处方组分成本，因为直接压片用稀释剂比其他稀释剂价格更昂贵。

但是还需考虑其他因素。在湿法制粒时，药物和稀释剂粒子各自的性质至少部分地被黏合剂所隐藏了。而在直接压片时，所呈现的仍然是原来的粒子。因此对于后者，还必须额外考虑粒子特性（如药物和稀释剂的粒径和形状）的批间一致性。在直接压片处方中，各组分均能作为单独的粒子进行运动，因此就有可能在混合后或压片前发生分

P

层。在制粒工艺中，粒子相互结合而不易发生分层，而且通过制粒可以减少粉尘生成，但直接压片则不能。

前述的直接压片工艺几乎无一例外地应用于含有强活性成分的处方，因此直接压片物料的特性源于所用的稀释剂。确有少数物质无需预处理即已具备充分的流动性和黏合性。这些物质通常是无机盐的结晶，如氯化钠和氯化钾。少数强活性成分已有直接压片用规格可供选用，如扑热息痛和维生素 C。它们可以直接压制或加入润滑剂后压制成片剂。但更准确地说，这些物质是“预制片”，即制粒过程——湿法制粒或预压——已经由辅料生产商完成了（参见本书“直接压片工艺”一章）。

加压状态下的粒子行为

所有的片剂生产可视为是用压力将一群粒子包封在特定空间内，因此了解这种环境中的粒子行为是理解片剂成

型和特性的关键。

1. 向冲模内的颗粒加压

两种固体间存在吸引力，这种力在本质上可能是非特异性的（如范德华力），或是特异性的（如能形成分子间氢键结合的分子所具有的吸引力）。但无论其本质如何，正是大量粒子之间存在的这些力的作用，才能够形成完整的片剂^[26]。其作用强度与粒子质量直接相关，而与粒子间距的平方呈反比。因此可以推测，对于少量的小粒子，只有当相邻粒子被压缩至相互紧密接触时才能形成片剂。这种接触需通过施加外力才能获得。

通过弹簧在负载前后的变化，能够表现单一粒子受压后的行为。详见图 5。尽管受压后的粉末与拉伸的弹簧不完全相同，但却能提供有益的对照。负荷对应压力，长度变化对应张力。

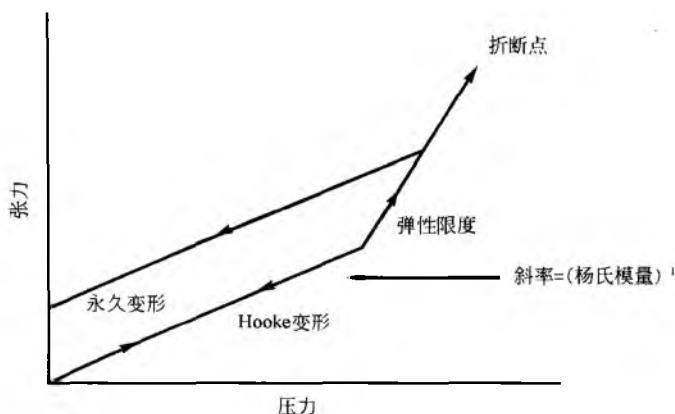


图 5 压力-张力关系

最初在压力和张力之间存在直线关系。当移去压力时，弹簧即恢复初始长度。这称为弹性行为且完全可逆。弹簧的行为遵循 Hooke 定律，曲线上相应部分的斜率的倒数即为弹簧的杨氏模量。

如果继续加压，最终会失去直线相关性，此时的压力点称为弹性限度。如果施加大于弹性限度的压力后再移去，则弹簧不会恢复初始长度。此时的长度变化是持久而不可逆的，称为塑性行为。继续增大负载将导致更进一步的塑性形变，直至负载增大到弹簧断裂为止。与之类似，当一定量的粒子被限定在压片机的冲模内并施加逐渐增大的压力时，随后的一系列现象可能会依序发生，但更有可能交叉发生。

粒子将发生重排并形成孔隙率较低的结构。当压力很低时，粒子相互滑行交错。该过程常伴随发生部分碎裂，因为在相对运动时其表面的粗糙纹理被磨去。

尽管粉床的孔隙仍然很多，但接下来的过程中粒子不再可能发生相对运动。进一步增大压力引发粒子的弹性形变、塑性形变或者破碎。三者中哪种情况会占优势取决于物料的性质，但最终结果都会使孔隙率进一步降低，而粒

子间的紧密接触增大。

如果仅发生弹性形变，则一旦移去压力，粒子将恢复原形。压缩所致的额外的粒子间接触消失，无法形成完整的片剂，见图 6。

然而一旦超过弹性限度后再移去压力，增加的粒子间接触部分消失，粒子依然维持凝聚状态而形成片剂。因此，从生产合格片剂的观点来看，由于那些弹性限度较低的物质在低压力下即能发生塑性形变，比弹性好的物质更适于压片。

如果粒子破碎产生粉体的聚合体，则会出现大量的粒子间接触点，片剂强度即以此为基础。此时若移去压力应该不会影响片剂强度，因为碎片不可能再重新合并成为原来的粒子。但是不太可能发生纯粹的由碎片组成的聚合体，因此仍须考虑移去施加在变形粒子上的压力后所产生的影响。

2. 经由粉床的压力传递

假设在偏轴压片机冲模内已经填充了一群粒子。通过下降的上冲施加压力而下冲固定不动，则压力将通过粉床

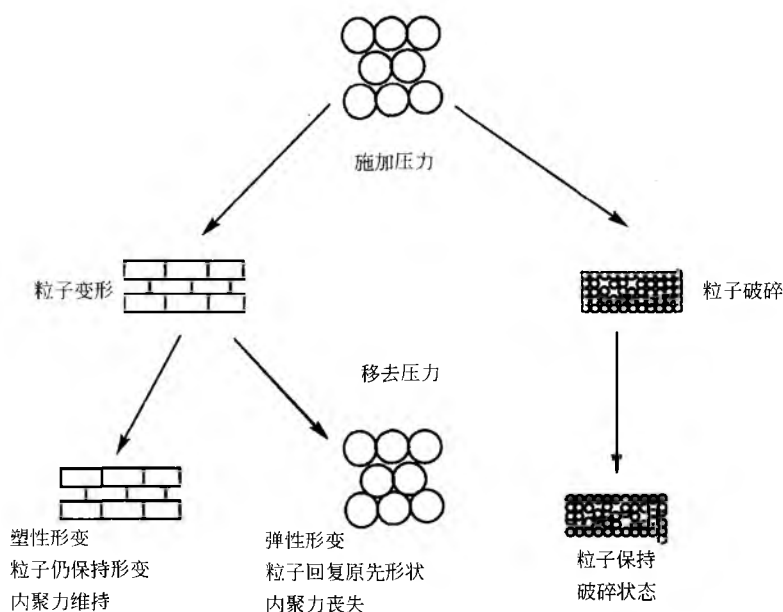


图6 粒子的弹性和塑性

传递给下冲。Train 将压力传感器埋在大量的粉末中^[27]，考察了粉床内的压力分布。结果发现，上冲在粉床内下降的过程中压力的减低并非是均匀一致的，而是遵循更为复杂的模式。这是由于压力被传递至模壁并被反射回来。压力分布的显著特点是，在接近移动冲头的外围是高压区域，而靠近垂直轴的粉体内则压力大幅降低。另一方面，低压区域处于同一轴向而更接近移动冲头，见图7。其后，Charlton 和 Newton 利用 γ 射线衰减法证实了 Train 的发现^[28]。

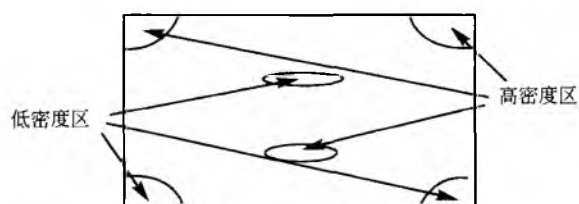


图7 偏轴压片机制备的片剂的密度分布

这种压力分布对片剂强度具有极大的影响。粒子形变，无论是属弹性或塑性，均与所用压力呈正比。如前所述，这种形变是形成粒子间键合作用的重要基础，而片剂完整性取决于键合作用。因此，片剂内部的孔隙甚至强度存在变化。片剂结构的最弱点将是受压力最小的点，例如片剂与静止冲头相邻的表面以及靠近移动冲头的中轴部位。由于片剂密度的不均匀性，其中某些部位的强度大于其他部位。

必须指出以上论点是建立在仅有一个冲头向粉体施加压力而另一个则静止不动的假设基础之上。对于偏轴压片机是符合实际的，但对于旋转压片机，两个冲头均移动并同时向粉床加压。在这种情况下，压力分布与图7有明显

不同，其结果是在靠近片剂表面附近有两个低密度区域，而在粉体中心部位附近有一个高密度区域。

这种情况下则必须考虑移去压力后对片剂的影响。此时会发生不同程度的弹性复原，进而导致粒子间键合强度的减弱和片剂强度的整体降低。因此若片剂因弹性复原而分裂，则很可能发生在它的强度最低点。这一点就处于上表面下方，这也是片剂生产经常会遇到的现象，称为迭片或顶裂。了解了以上内容，就能解释与顶裂相关的影响、诱因及其实际解决方法。

多年来一直认为顶裂是片剂内留存空气的结果，甚至在真空状态下生产片剂仍然会发生顶裂的事实也没能推翻这种理论。而该理论也没有解释为什么空气仅会导致片剂表面下方产生断裂。然而，考虑到片剂中密度分布的不均匀性，显然顶裂的缺陷并非空气本身的存在所致，而是在片剂中那些孔隙率高的部分相对而言缺少固体所致^[29]。在压片过程中，片剂结构中充满空气的小孔内压力逐渐升高，这会明显地促进片剂在压力移去后发生分裂。因而，在压片过程中任何能够阻碍空气从粉体中逸出的因素都将加剧顶裂，尽管这些因素并非根本的诱因。这些因素包括冲头和冲模之间的空隙、加压的速度、微细粒子的存在，它们使空气逸出片剂的通路变得更加曲折^[30]。

当施加的压力超过片剂的断裂强度时也会使片剂在最弱点崩裂。片剂受压后从冲模中移出时将受到几种压力。片剂压缩成形的冲模内的某点可能会发生磨损，例如该点比其他点有极小幅度的变宽。因而当片剂弹出时被迫通过一个直径略小于片剂本身的孔穴。此时片剂受到明显的压迫，粒子间键合力可能在其最弱点被克服。此外，当片剂被挤出模外时，不仅在轴向而且在径向将发生弹性膨胀。径向膨胀是逐渐进行的，例如，当片剂的一部分能够自由

膨胀时,其下方的另一部分仍受到冲模的局限,此时键的断裂是必然的结果。

P

压制过程的表征

人们已经设计出一系列参数以试图描述粉末压制的过程,这些参数不仅阐明压制的原理,而且还能预测可压性。这些参数大多取决于精确测定压力和冲头位置的方法的实用性。

1. 压力和冲头运动的测量

任何压片过程的目标都是生产质量合格的片剂。事实上片剂的所有性质,如孔隙率、物理强度、崩解时间、溶出时间等,均在一定程度上取决于冲头对冲模内粒子所施加的压力。

多年来对片剂性质进行了大量研究,但直至可精确测定压力的方法出现后,才能开展有意义的研究。

该领域发展的关键是由 Higuchi 等^[31]在 20 世纪 50 年代引入了所谓的“仪器化压片机”,将压力传感器置入压片机用于测定所载的负荷。由于模内的粒子质量决定了传感器检测到的压力^[32],这一对压片过程的革新性研究引发了自动片重控制型压片机的研制。

压力传感器又称为应力表。最简单的应力表由网络状的线路组成,并有电流穿过其中。将线路可靠地安装在压片机的一个部件(如上冲)上,当向冲头施加压力时,该部件发生形变。压力大小与冲头材料的杨氏模量值决定了形变(张力)的强弱。应力表的线路也同时发生形变,进而电阻发生改变。如果应力表采用惠斯登电桥环路,则输出电压发生微小变化。应力表的信号强度与形变量成正比,而后者又是所加压力的函数。因此,经过放大和适当校正后,电压变化可以描述为所施加的压力变化。转换器的信号输出至示波器或图形记录仪,或自动存储并最终由计算机进行处理。

更大的进步是将位移传感器与压片机相结合。同样是输出电子信号,但信号强度取决于感应装置相对于固定参照点的位移,由此可测量冲头的运动。如前所述,信号被放大、记录并储存。若将压力和位移传感器的测量结果相结合,若已知某时间点所施加的压力大小,就能计算出同一时刻冲头的位移。

若将传感器直接与冲头相连,则旋转压片机的测定难度比偏轴压片机更大。由于压片机具有旋转架,无法在传感器和记录装置之间建立固定不动的连接,可以用滑环和无线电遥测器替代固定连接。另一个方法是将传感器与压片机上远离冲头而不发生旋转的位置相连接。Watt^[33]综述了偏轴和旋转压片机连接传感器的技术、校正方法以及仪器化压片机输出信息的应用。

图 8 为连接在偏轴压片机上下冲头的压力和位移传感器的输出结果。上冲显示出其下降并穿过冲模(A点)完成压制过程后再回升离开冲模(B点)的近似 S 形的路径。

下冲在压制期间固定不动,随后上升并将片剂从冲模中推出(C点)。

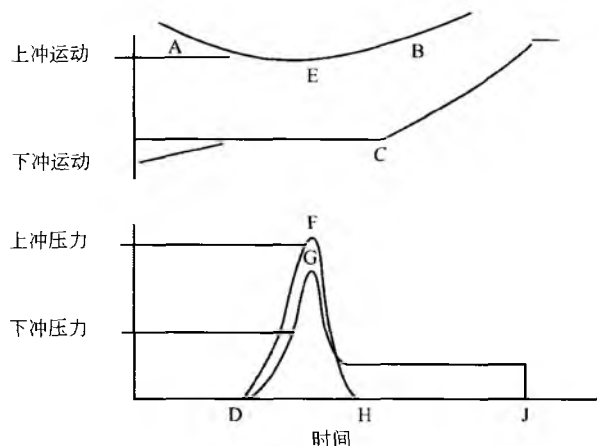


图 8 仪器化偏轴压片机的压力和位移数据

随着上冲进入冲模与粒子相接触,粒子的床高减小而孔隙率下降。最初孔隙率的降低是由粒子重排所致。此时所需的压力非常小,甚至压力传感器也可能无法检测而输出结果显示为零。接下来当通过重排已经无法获得进一步的压缩时,上冲的运动受阻(D点)。上冲压力传感器的输出值因此增大,起初缓慢而随后较快。在此期间粒子发生形变和(或)破碎而形成紧密黏结的片剂。压力被传递至下冲,而下冲传感器亦检测到类似的增大。当上冲下降到达最低点(E点)时,两冲检测值均达到压力最大值(F和G点),但下冲值低于上冲。

达到最大值后,上冲开始回升,两冲所检测到的压力均下降。当离开上升的下冲和片剂上表面后,上冲压力值降至零点(H点)。而下冲压力值直至出片完成后才下降为零。出片弹力越大,处方中所需的润滑剂就越多。

下冲压力最大值低于上冲的原因是所加压力的一部分由上冲传递给了模壁,进而产生了模壁的摩擦。润滑剂能够减轻这种摩擦。因此,上下冲压力最大值的比值(常称为R值)可用于比较润滑剂的作用强弱^[34]。R最大值为1,而硬脂酸类润滑剂的R值通常都大于0.95。

从D点降至F点所需的时间称为固结时间,也是上冲可测得压力的时间段。接触时间是指上冲与原料粒子或片剂相接触的时间段(D点到H点)。驻留时间是下冲能够检测到压力的时间段(D点到J点),该时间止于出片完成时。

旋转压片机的传感器输出值有两点差异。首先,下冲在压片过程中处于主导地位并在上冲下降的同时向上运动。第二点差异很小但很重要。由于偏轴压片机的上冲发生的是曲折移动,冲速仅在其反向运动的一瞬间为零(E点)。而旋转压片机的冲头部有一个平面,当冲床穿过压力辊下方或上方时,该平面无法反映出冲床的运动。这一现象发生的时间称为驻留时间,尽管持续时间不到一秒,仍对固

结过程产生重要的影响^[35,36]。

2. 片剂强度概况

片剂的物理强度取决于粒子间键合的程度和强度，而后者与所加的压力相关。因此，压力与有关片剂强度的参数之间的相关性能够很好地预测用指定物料生产合格片剂的难易程度，同时也可能有助于深入考察固体的压制机制及其机械性质。

片剂强度常以在给定方向上（如径向）粉碎片剂所需的压力来表示。过去常称之为片剂的“硬度”，但在本文中则是错误的术语。在材料科学中，硬度是与耐压性有关的表面性质。物理强度或机械强度等术语在此处更适宜。

压力采用前述的仪器化压片机测定。片剂的物理强度采用多数现行药典所述的脆碎装置进行测定。测定结果通常以压力为横坐标、强度为纵坐标的图形显示。

这种测试技术非常适于比较相同大小和形状的药片，例如用于在线控制。然而，实际应用时当测定的片剂不完全相同时，可能产生某些问题。压力有时表示为压强，由压力除以冲头截面积而得。当冲头是平面时，这种方法是有效的，因为很容易计算出面积。但在实际应用中通常并非如此，压力和压强之间的转换包括对冲头面积的估计，而这种估算通常不准确。

片剂的物理强度还取决于其大小。在绘制压力-强度图时，若使用相同的压片工具则所得的所有片剂都将具有相同的截面积。但随着压力的改变，片剂高度发生变化。因而基于破碎强度的比较方法实际并不是真正有效的。

通过计算片剂的抗张强度曾经部分地避免了这一问题。最常用的方程式见式（1），由 Rudnick 等^[37]以及 Fell 和 Newton^[38]提出。

$$T_s = 2P/\pi dt \quad (1)$$

式中： T_s 为片剂的抗张强度，MPa； P 为脆碎强度，N； d 为片剂直径，m； t 为片剂厚度，m。

式（1）适用于具有直径且整个表面高度恒定的圆柱形片剂。Newton 等还尝试将抗张强度的概念引入非圆柱形片剂中^[39]。

由于表示压力或压强以及片剂强度的单位常发生混淆。表 7 列举了近来片剂强度图的坐标轴所用的单位。如果作者使用且期刊编辑也坚持使用国际单位制，将为比较不同的片剂处方提供极大的便利。长度的国际单位是米，力是牛顿，而压强是帕斯卡。物理强度的单位是牛顿，从式（1）计算得到的抗张强度单位则是帕斯卡。

3. 片剂的多孔性与压缩力或压强之间的关系

图 8 表示压片机上下冲相对于固定参照点的运动情况，由图可知，能够计算出两冲头之间的距离。若两冲头均与片剂相接触，则二者的间距与片剂高度（ h ）相等。若冲模截面积（ a ）、片重（ w ）和片剂原料固体的真密度（ ρ ）均已知，则由式（2）可计算出片剂的孔隙率（ ϵ ）。

$$\epsilon = 1 - (w/ah\rho) \quad (2)$$

表 7 用于描述片剂强度的单位

横坐标参数	单位	纵坐标参数	单位
压力	kg	脆碎强度（硬度）	kg
	lb		Strong Cobb 单位
	kN		N
	N		kp
压强	kg/cm ²	抗张强度	kg/cm ²
	Pa		Pa
	MPa		MPa
	lb/in ²		

对于圆柱形片剂，式（2）可以转化为式（3）：

$$\epsilon = 1 - (4w/\pi d^2 h\rho) \quad (3)$$

从图 8 还可计算出同一时间所施加的压力（或压强），从而建立起压力和孔隙率之间的关系。

图 9 所示为压力和孔隙率之间的典型关系。当压力从零开始增大时，片剂的孔隙率迅速降低，但继续增大压力将产生持续减弱的影响。当曲线变得水平时孔隙率数值取决于被压缩的固体。与能破碎的物质相比，由能发生塑性变形的物质生产的片剂通常具有较低的孔隙率。

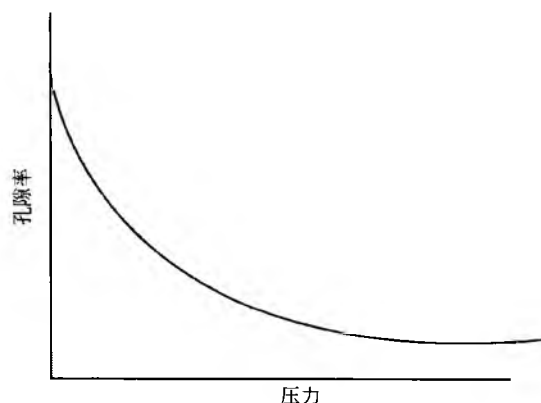


图 9 压力-孔隙率图

在试图对图 9 进行数学表达时得到了大量的方程式。对此 Kawakita 和 Ludde^[40]已经进行了综述。需要强调的是这些方程是数据的简易数学表达，不具有潜在的物理学意义。

其中应用最多的是 Heckel 关系式^[41]：

$$\ln 1/(1-D) = kP + A$$

式中： D 指片剂的相对密度； $(1-D)$ 指孔隙率； P 为所施加的压力； k 和 A 是常数。

该方程预示出以 $\ln 1/(1-D)$ 对 P 所作的图将产生斜率为 k 、截距为 A 的一条直线。Heckel 猜测斜率越大则压缩后固体的塑性程度越大。Hersey 和 Rees 将 k 的倒数定义为固体的平均屈服压。

图 10 为典型的 Heckel 曲线。在低压和高压处通常会偏离线性。这一点是可以预料的。在低压时，孔隙率的减小主要是粒子重排所致，因而真正的固结机制，即破碎或形变，仅占整个固结过程的一小部分。而在高压下，孔隙率变得极低而其倒数则很大。

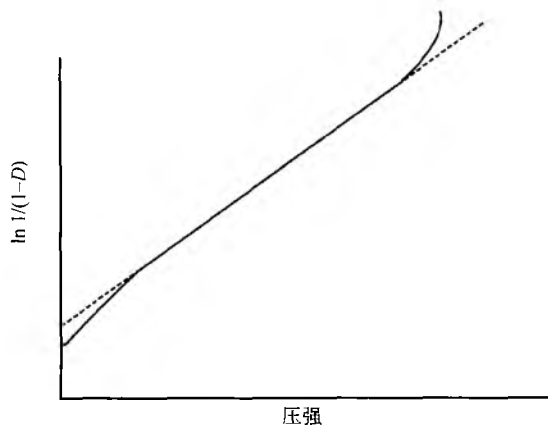


图 10 按 Heckel 方程绘制的压强-孔隙率图

然而 Heckel 曲线的真正问题在于如何确定实际的直线区域。在设计压强-孔隙率图之初，仪器化压片机并未得到广泛应用。片剂高度只能在弹出冲模后进行测定，此时高度的净变化是固结后高度下降值和弹性膨胀后高度增加值合并后的结果。此外，通常的曲线图仅由少数几个点组成，只能由此确定表现呈线性的区域。随着测试仪器的发展尤其是与计算机相连接后，可在片剂弹出冲模之前测量其高度，进而绘制出由数百个点组成的 Heckel 曲线。根据笔者的经验，组成压强-孔隙率图的点越多，就越难确定真正的线性区域。

Paronen 和 Ilkka 描述了 Heckel 及其他压缩方程的应用，并提示了用其解释的难点^[43]。

4. 压力-位移曲线

图 8 显示压力和冲头位移随时间变化，因而可能确定任意时间点的压力值和位移值，并由此建立压力-位移曲线。如图 11 所示，一般以压力为纵坐标、位移为横坐标。

曲线下面积的单位是压力（牛顿）和距离（米）的乘积，等同于功或能量（焦耳）。因此，压力-位移曲线可用于计算固体压制过程中所损耗的功^[44]。

随着技术的不断改进，已能够预测固体物料的弹性和塑性。若粒子完全无弹性，则一旦上冲达到最大下降深度后开始回升，就不再与片剂接触了。此时上冲所载传感器记录的数值立即降为零。然而实际上是不会发生这种情况的，图 8 中上冲位移达到最大值时的压力值显示了这一点。这只能意味着当上冲上升时，片剂发生弹性膨胀并与冲头保持接触。因而图 11 中的面积 ABC 代表了压缩固体膨胀所作的功，面积 DBC 代表功通过膨胀的片剂传递回上冲。两面积之差（即 ABD）被称为压制过程的“净功”。

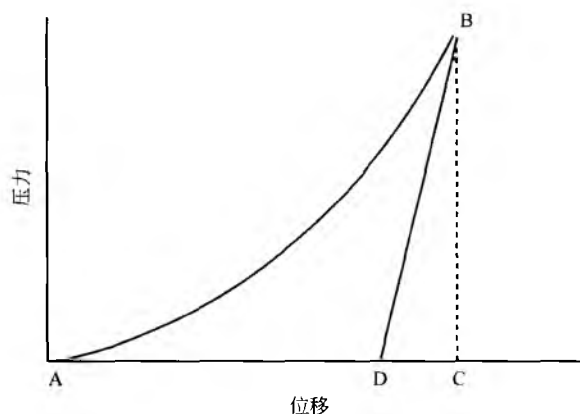


图 11 压力-位移曲线

运用该技术已经证明制粒剂的存在导致粉体塑性显著提高，并最终增大了黏合性和片剂强度。粒子间的制粒剂薄膜被认为是具有高耐压值的强黏性液体。当所施加的压力超过其耐压值时，粒子发生形变，且在压力降至耐压值以下后依然保持不变^[45]。可以用一种有点类似的机制说明一些直接压片用片剂稀释剂的性质，如喷雾干燥乳糖，它是由无数微细晶体嵌入一种无定形且更易于变形的骨架中构成的。

压力-位移曲线已被广泛用于描述压缩过程，但需依赖灵敏且合理校正的传感器。即便是在高压值下测定的位移有微小的误差也会极大地影响曲线下面积的计算值。Ragnarsson 详细回顾了压力-位移曲线的应用和潜在不足^[46]。

5. 时间依赖性效应

很早以前就已经知道对于某些处方，改变压片机的运行速度或压片机类型会对片剂质量产生极大影响。例如将处方研究中所用的低速偏轴压片机在生产过程中更换为高速旋转压片机，就可能会发生这样的情况。

如前所述，根据传感器输出值对时间所作的图表可以确定诸如接触时间和驻留时间等参数（见图 8）。同样地，位移-时间图的斜率等于冲压速率，压力-时间图的斜率则等于压力变化速率。当改变压片机的运转速率时，所有参数都会按一定比例发生变化。

许多物质的固结过程具有时间依赖性，因此以上考虑是非常重要的。碎裂实际上可视为一个瞬间过程。但发生形变的物质具有类似黏弹性的行为，而施加压力的时间是至关重要的。若减少加压时间，这些物料将显示出较低的固结性，进而影响片剂的物理强度。例如，Armstrong 和 Palfrey^[47]研究了冲压速度变化对 4 种直接压片稀释剂所制成的片剂强度的影响。尽管所有片剂的强度均有所下降，但改性淀粉等的降低值最大。Roberts 和 Rowe^[48]考察了一系列固体的耐压性对冲压速度变化的相对敏感度，也发现能发生压缩形变的那些固体显示出极大的改变。

偏轴压片机的固结速率取决于上冲进入冲模的速度。

后者又取决于压片机的偏轴臂长和运行速度。对于旋转压片机, 冲压速度取决于模板直径、轧辊直径、冲头几何形状以及运行速度。现有公式能够计算两种压片机在压制周期内的任意时间点的冲压速度^[49,50]。

区分冲头速度和压片机生产率很重要。尽管旋转压片机的生产率远远高于偏轴压片机, 但主要归因于前者具有多个冲位, 而并不一定代表其具有很高的冲头速度^[51]。

如果将压片时所作的压缩功(焦耳)除以时间(秒), 可得压缩功率(瓦特)。另一个计算压缩功率的方法是压力乘以该压力下的冲压速度, 这可由图8的数据推算得到。如此可以对不同压片机的压缩过程进行比较^[49]。

参考文献

1. Editorial; The Passing of the Tablet Fad, *Pharm. J.* 1895, February 12.
2. Castello, R. A.; Mattocks, A. M. Discoloration of Tablets Containing Amines and Lactose, *J. Pharm. Sci.* 1962, 51 (1), 106—108.
3. Carstensen, J. T.; Ertell, C. Physical and Chemical Properties of Calcium Phosphate for Solid State Pharmaceutical Formulations, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1990, 16 (7), 1121—1133.
4. Campbell, H.; Bauer, W. C. Cause and Cure of Demixing in Solid—Solid Mixers, *Chem. Eng. Sept.* 1966, 179—185.
5. Staniforth, J. N.; Rees, J. E.; Kayes, J. B. Relation between Mixing Time and Segregation of Ordered Mixes, *J. Pharm. Pharmacol.* 1981, 33, 175—176.
6. Sherrington, P. J.; Oliver, R. Granulation. Heyden and Sons; London, 1981.
7. Ertel, K. D.; Zoglio, M. A.; Ritschel, W. A.; Carstensen, J. T. Physical Aspects of Wet Granulation. IV. Effect of Kneading Time on Dissolution Rate and Tablet Properties, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1990, 16 (6), 963—981.
8. Kristensen, H. G.; Schaefer, T. Granulation; *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1987, 13 (4/5), 803—872.
9. Rubinstein, M. H.; Ridgway, K. Solute Migration during Granule Drying, *J. Pharm. Pharmacol.* 1974, 26, 24P—29P.
10. Armstrong, N. A.; March, G. A. Quantitative Assessment of Surface Mottling of Colored Tablets, *J. Pharm. Sci.* 1974, 63 (1), 126—129.
11. Augsburger, L. L.; Shangraw, R. F. Effect of Glidants in Tableting, *J. Pharm. Sci.* 1966, 55 (4), 418—423.
12. Lerk, C. F.; Bolhuis, G. K.; Smedama, S. S. Interactions of Lubricants and Colloidal Silica During Mixing with Excipients, *Pharm. Acta Helv.* 1977, 52 (3), 33—39.
13. Bowden, F. P.; Tabor, D. The Friction and Lubrication of Solids, 2nd Ed.; Clarendon Press; Oxford, 1964.
14. Miller, T. A.; York, P. Pharmaceutical Tablet Lubrication, *Int. J. Pharm.* 1988, 41, 1—19.
15. De Boer, A. H.; Bolhuis, G. K.; Lerk, C. F. Bonding Characteristics by Scanning Electron Microscopy of Powders Mixed with Magnesium Stearate, *Powder Tech.* 1978, 20, 75—82.
16. Bolhuis, G. K.; Holzer, A. W. Lubricant Sensitivity. *Pharmaceutical Powder Compaction Technology*; Alderborn, G., Nystrom, C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1996; 517—560.
17. Ragnarsson, G.; Holzer, A. W.; Sjogren, J. Influence of Mixing Time and Colloidal Silica on the Lubricating Properties of Magnesium Stearate, *Int. J. Pharm.* 1979, 3, 127—131.
18. Holzer, A. W.; Sjogren, J. Evaluation of Sodium Stearyl Fumarate as a Tablet Lubricant, *Int. J. Pharm.* 1979, 2, 145—153.
19. Salpekar, A. M.; Augsburger, L. L. Magnesium Lauryl Sulfate in Tableting: Effect on Ejection Force and Compressibility, *J. Pharm. Sci.* 1974, 63 (2), 289—293.
20. Shangraw, R. F.; Mitrevej, A.; Shah, M. A New Era of Tablet Disintegrants, *Pharmaceutical Technology* 1980, Oct., 49—57.
21. Shotton, E.; Leonard, G. S. Effect of Intragranular and Extragranular Disintegrants on the Particle Size of Disintegrated Tablets, *J. Pharm. Sci.* 1976, 65 (8), 1170—1174.
22. Lowenthal, W. Disintegration of Tablets, *J. Pharm. Sci.* 1972, 61 (11), 1695—1711.
23. van Kamp, H. V.; Bolhuis, G. K.; de Boer, A. H.; Lerk, C. F.; Lie-A-Huen, L. The Role of Water Uptake on Tablet Disintegration, *Pharm. Acta Helv.* 1986, 61 (1), 22—29.
24. Malkowska, S.; Khan, K. A. Effect of Recompression on the Properties of Tablets Prepared by Dry Granulation, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1983, 9 (3), 331—347.
25. Bolhuis, G. K.; Chowhan, Z. T. Materials for Direct Compression. *Pharmaceutical Powder Compaction Technology*; Alderborn, G., Nystrom, C., Eds.; Marcel Dekker, Inc. New York, 1996; 419—500.
26. Nystrom, C.; Karehill, P. G. Intermolecular Bonding Forces. *Pharmaceutical Powder Compaction Technology*; Alderborn, G., Nystrom, C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1996; 17—53.
27. Train, D.; Lewis, C. J. Agglomeration of Solids by Compaction, *Trans. Inst. Chem. Engrs.* 1962, 40, 235—263.
28. Charlton, B.; Newton, J. M. Application of Gamma-Ray Attenuation to the Determination of Density Distri-

P

- butions Within Compacted Powders, *Powder Technol.* 1985, 41, 123—134.
29. Ritter, A.; Sucker, H. B. Studies of Variables that Affect Tablet Capping, *Pharm. Technol.* 1980, July, 24—34.
30. Mann, S. C.; Roberts, R. J.; Rowe, R. C.; Hunter, B. M.; Rees, J. E. The Effect of High Speed Compression At Sub-Atmospheric Pressures on the Capping Tendency of Pharmaceutical Tablets, *J. Pharm. Pharmacol.* 1983, 35, 44P.
31. Higuchi, T.; Nelson, E.; Busse, L. W. The Physics of Tablet Compression. 3. The Design and Construction of an Instrumented Tableting Machine, *J. Am. Pharm. Assn. Sci. Ed.* 1954, 43, 344—348.
32. Murray, F. J. Tablet Press Automation; A Modular Approach to Fully Integrated Production, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1996, 22 (1), 35—43.
33. Watt, P. R. Tablet Machine Instrumentation in Pharmaceuticals—Principles and Practice; Ellis Horwood; Chichester, 1988.
34. Nelson, E.; Naqvi, S. M.; Busse, L. W.; Higuchi, T. The Physics of Tablet Compression. 4. Relationship of Ejection and Upper and Lower Punch Forces during the Compressional Process, *J. Am. Pharm. Assn. Sci. Ed.* 1954, 43, 596—602.
35. Akande, O. F.; Ford, J. F.; Rowe, P. H.; Rubinstein, M. H. The Effects of Lag-Time and Dwell-Time on the Compaction Properties of 1: 1 Paracetamol/Microcrystalline Cellulose Mixtures Prepared by Precompression and Main Compression, *J. Pharm. Pharmacol.* 1998, 50, 19—28.
36. Munoz-Ruiz, A.; Jimenez-Castellanos, M. R.; Cunningham, J. C.; Katdare, A. V. Theoretical Estimation of Dwell and Consolidation Times in Rotary Tablet Machines, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1992, 18 (19), 2011—2028.
37. Rudnick, A.; Hunter, A. R.; Holden, F. C. An Analysis of the Diametral Compression Test, *Mater. Res. Stand.* 1963, 3, 283—289.
38. Fell, J. T.; Newton, J. M. Determination of Tablet Strength by the Diametral Compression Test, *J. Pharm. Sci.* 1970, 59 (5), 688—691.
39. Pitt, K. G.; Newton, J. M.; Richardson, R.; Stanley, P. Material Tensile Strength of Convex-Faced Aspirin Tablets, *J. Pharm. Pharmacol.* 1989, 41, 289—292.
40. Kawakita, K.; Ludde, K. H. Some Consideration on Powder Compression Equations, *Powder Technol.* 1970, 4, 61—68.
41. Heckel, R. W. Density-Pressure Relationships in Powder Compaction, *Trans. Metall. Soc. AIME* 1961, 221, 671—675.
42. Hersey, J. A.; Rees, J. E. Deformation of Particles during Briqueting, *Nature* 1971, 230, 96.
43. Paronen, P.; Illka, J. Porosity-Pressure Functions. *Pharmaceutical Powder Compaction Technology*; Alderborn, G., Nystrom, C. Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1996; 55—75.
44. de Blaey, C. J.; Polderman, J. Compression of Pharmaceuticals. I the Quantitative Interpretation of Force-Displacement Curves, *Pharm. Weekblad* 1970, 105, 241—250.
45. de Blaey, C. J.; van Oudtshoorn, M. C. B.; Polderman, J. Compression of Pharmaceuticals. III. Study on Sulphadimidine, *Pharm. Weekblad* 1971, 106, 589—599.
46. Ragnarsson, G. Force-Displacement and Network Measurements. *Pharmaceutical Powder Compaction Technology*; Alderborn, G., Nystrom, C. Eds.; Marcel Dekker, Inc. New York, 1996; 77—97.
47. Armstrong, N. A.; Palfrey, L. P. The Effect of Machine Speed on the Consolidation of Four Directly Compressible Tablet Diluents, *J. Pharm. Pharmacol.* 1989, 41, 149—151.
48. Roberts, R. J.; Rowe, R. C. The Effect of Punch Velocity on the Compaction of a Variety of Materials, *J. Pharm. Pharmacol.* 1985, 37, 526—528.
49. Armstrong, N. A.; Abourida, N. M. A. H.; Gough, A. M. A Proposed Consolidation Parameter for Powders, *J. Pharm. Pharmacol.* 1983, 35, 320—321.
50. Rippie, E. G.; Danielson, D. W. Visco-Elastic Stress—Strain Behavior of Pharmaceutical Tablets; Analysis during Unloading and Postcompression Periods, *J. Pharm. Sci.* 1981, 70 (5), 476—482.
51. Armstrong, N. A. Time-Dependent Factors Involved in Powder Compression and Tablet Manufacture, *Int. J. Pharm.* 1989, 49, 1—13.

(王文革 译)

前药设计

Bernard Testa

Joachim Mayer

University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

前药设计的一个案例

在药物研究中药物的分布和代谢是非常重要的,因为药动学和药效学过程相互依赖。有限的肠内吸收、不合适的分布、快速的代谢和有毒的代谢产物是在开发过程中药物候选者失败的部分原因。为了减少由于这种药物代谢缺陷造成的损耗比例,在筛选先导化合物时应该尽可能早地开始研究分布和代谢。

因而避免可预见的或被证实的药动学缺陷在药物研究过程中具有很重要的作用。但是,药动学(PK)和药效学(PD)优化也许不能兼得,这意味着在PK优化时靶点的药效有可能降低或者失去^[1]。治疗人的A型和B型流行性感冒的神经氨酸酶抑制剂新药是符合这种情形的例子。在该例子中,靶向的合理设计导致了亲水性很高、吸收不好的化合物Ro-64-0802的出现,在体外酶抑制效率很高,但由于它的高极性而只有很低的口服生物利用度^[2]。为了克服这个问题,Ro-64-0802以其乙基酯前药奥司他韦上市(图1)。在肠内吸收后,前体药物快速酶水解,产生的活性物质能维持很高的和持久的血浆浓度。正如这个例子所说明的,前体药物的概念可以认为是有价值的解决药动学和药效学优化问题的途径。换句话说,不通过单一合理的设计过程试图改进先导化合物,而通过采用前体药物的概念来研究有很高体外活性的化合物,也许能实现PK的优化。本文介绍一些有关在前体药物设计中感兴趣的概念。

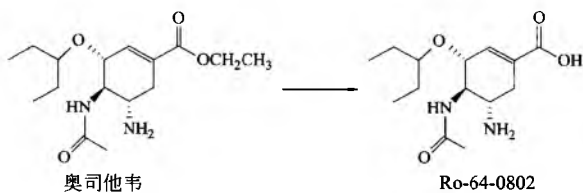


图1 神经氨酸酶抑制剂Ro-64-0802
及其乙基酯前体药奥司他韦

前体药物设计的目标和原理

前体药物定义为本身无活性的治疗剂,但预见可以转化活性的代谢产物^[3,4]。前药与软药不同,后者本身有活性,而代谢产物无活性。

前体药物设计的目的在于克服阻碍药物有效性的诸多屏障(表1),前体药物设计的主要目标是源自这些考虑,

表1列出了这些目标。

表1 阻碍药效的屏障和相应的前药设计目标^[3]

药物的屏障	药物的目标
化学稳定性不够	改善化学稳定性
溶解度不好	改进处方,如提高水中溶解度
味道或气味不好	增加患者的接收度和顺应性
刺激或疼痛	
药动学屏障	药动学目标
口服吸收差	提高生物利用度
显著的系统前代谢	延长作用时间
作用时间短	增强器官选择性
体内分布不佳	
药效学屏障	药效学目标
毒性	降低副作用

在前体药物设计中很多成功例子已有记载,并且很多这样的化合物已证实有治疗价值。当研究前体药物时,一些补充的观点可以采用,如它们的化学分类、活化机理[如酶的和(或)非酶的]、组织选择性、有毒代谢产物生成的可能性以及获得的治疗益处(表2)。

表2 前药设计中补充的观点

化学分类
生物前体
经典的载体连接的前药
定位化学传送系统
大分子前药
药物-抗体结合物
活化机理
酶 \rightarrow 生物学差异
非酶 \rightarrow 无生物学差异
组织/器官选择性机理
经典前药的组织选择性活化
定位传送特别的化学系统
潜在毒性
来自代谢中间体
来自载体部分或代谢物?
治疗益处
上市药物的前药(事后设计);中等至明显的益处
困难候选物的前药(事前设计);明显至显著的益处

化学分类区别在于载体连接的前体药物（药物通过一个不稳定的桥与载体连在一起）和生物前体，后者不含载体基团，而通过代谢产生活化官能团^[4]。在前者，载体部分通常方便地连接到极性基团，例如—OH、—NHR 和—COOH。生物前体的相关例子为化疗药，其通过缺氧细胞的还原而活化。因而，从 3-氨基-1, 2, 4-苯三嗪-1, 4-二氧化物上失去一个电子给细胞毒素—氧化氮被认为是该生物前药抗癌活性的机理^[5]。这种生物前药是一类有活性的前体药物，因为它们避免了由载体造成的潜在毒性问题。然而，必须注意中间代谢物。一类特殊载体连接的前药是定位的化学传递系统^[6]。大分子的前药是药物与蛋白质、多肽、多糖和其他生物可降解高分子材料通过共价键连接（直接或通过基团）的合成复合体^[7]。一个特殊的例子就是药物与单克隆抗体偶联。

前药的活化通过酶、非酶或连续作用（酶活化然后是非酶的重排）。应尽可能减小生物学的变化，因此，目前受到特别关注的是非酶的分子内环合-消除^[8]，下文会详细介绍。组织或器官的靶向问题是前药设计的另一个重要方面。已经进行了各种尝试以实现前药的器官选择性活化，如皮肤输送^[9]和脑的渗透^[6]。例如在肾脏选择性地存在半胱氨酸结合的 β 裂解酶，表明可以利用这种酶将含巯基的药物输送至该器官^[10]。

代谢中间体、载体部分和片断的潜在毒性也必须牢记于心。这可通过 *N*-和 *O*-乙酰氧甲基衍生物或 Mannich 碱释放甲醛的前药来举例说明。同样的，作为抗炎药芳基乙酸潜在生物前药进行分析的芳基乙烯，由于产生一种烯酮中间体，多年前已证明有很强的毒性。由前药获得的治疗益处是没有普遍结论的。既取决于药物又取决于前药，治疗上的益处可能是适度的、明显的、甚至显著的。如果上市的药物具有有用的性质，但也有不理想特性时，期待的治疗益处通常是从适度到明显。如果候选药物表现出优秀的靶向性，但也具有严重的理化和（或）药理学缺陷，设计前药可以获得显著的益处。

前药的化学活化：环合-消除反应

如此多的化学因素可以影响酶的反应，从而导致种属间和个体间的变异性，使得前药设计的不可靠有时甚至有问题。为了克服这样的困难，大量的研究建议前药通过一种纯粹的或者是非酶的机理活化。这种前药包括：

- (2-氧-1, 3-二氧-4-基) 甲酯；
- Mannich 碱；
- 1, 3-氧氮杂环戊烷；
- 具有碱侧链、空间上可以催化分子内水解的酯；
- 经历分子内亲核环合-消除的酯和酰胺。

在此我们关注通过分子内环合-消除而活化前药^[8,11]，这些反应发生在特殊设计的前药中，如苯酚、乙醇和胺等前药。有很多设计策略可以实现这些机理，下面用一些例子说明。这些反应的总化学原理用图 2 表示。载体侧链通过

羰基基团与药物结合（成酯或成酰胺），而且包含一个亲核基团，用“Nu”表示。亲核基团在亲核取代反应中直接进攻羰基，反应的结果是载体的环合和药物分子的消除。

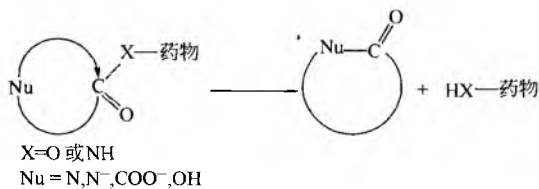


图 2 前药通过环合-消除活化的一般反应示意图^[11]

1. 基于碱性氨基基团的环合-消除

碱性氨基基团的亲核攻击已经证明是一种实现和调节环合-消除的有用策略。辐射感光剂 5-溴-2'-脱氧尿嘧啶核苷用二氨基酸制备成衍生物，得到如图 3 所示的前药，R=H 或环己基^[12]。环合反应得到药物和一种哌嗪酮衍生物，而且没有发现其他产物。在酸性溶液中没有发生水解。在 pH 7.4 和 37℃ 的缓冲溶液中，这两种前药的半衰期分别是 23min 和 30min。在相同条件下的人体血浆中，这个值分别是 70min 和 47min，表明通过与蛋白质结合保护其免于降解。在大鼠的血浆中，第一个化合物的半衰期是 47min，再次表明有保护作用。但是第二个化合物的半衰期是 5min。这表明大鼠血浆水解酶的水解作用在某些情况下还会发挥作用。

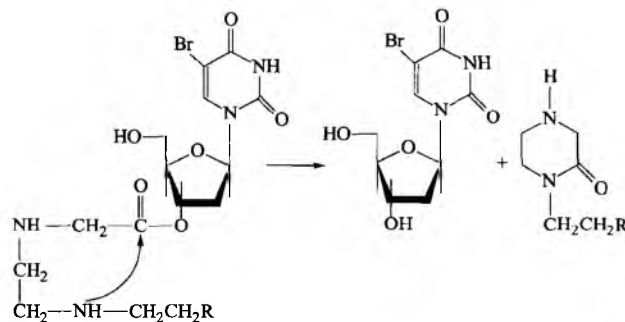
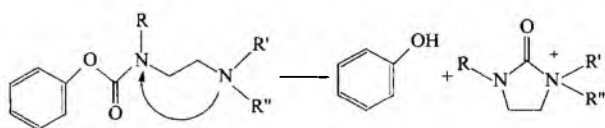


图 3 5-溴-2'-脱氧尿嘧啶核苷的碱性酯前药通过环合而活化^[12]

因此，环化消除的分子内活化因为空间因素而得到调节。而且，这个例子表明水解可能通过酶催化，取决于酶底物和生物条件。

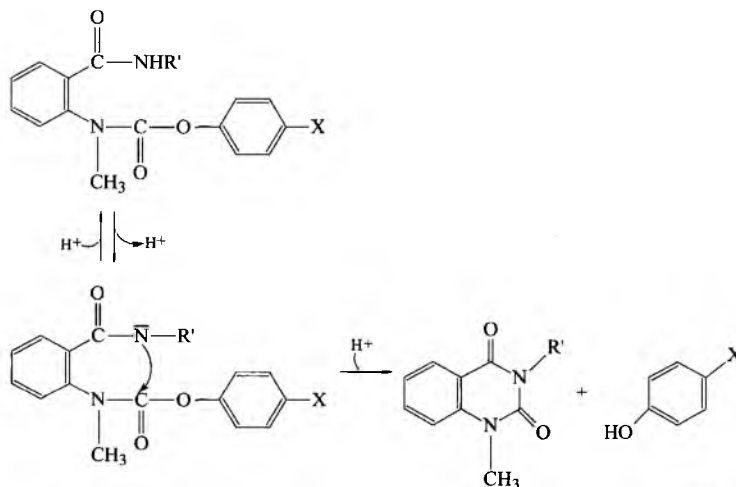
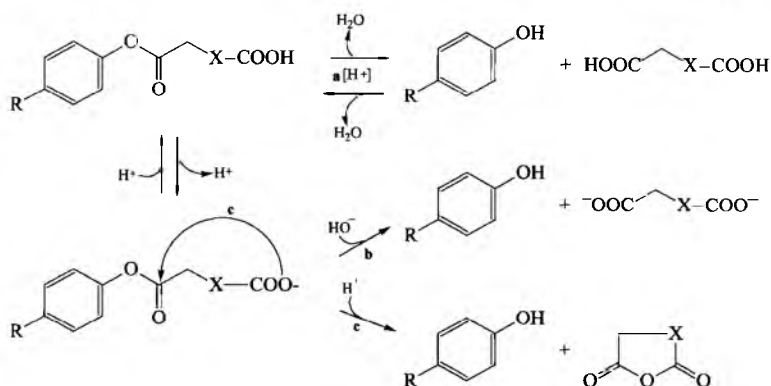
在关于乙二胺的苯基氨基甲酯反应性的信息研究中可以得到有价值的发现^[13]（图 4）。pH 7.4 和 37℃ 条件下它们化学活化的半衰期在表明：*N*, *N'*-二甲基和 *N*, *N'*, *N'*-三甲基取代的环合速度最快，而 *N*-H、*N'*-H 和（或）*N*-甲基基团显著地减慢了反应。这个研究的其他主要意义是证明没有发生酶的水解反应。事实上，这些化合物在人体血浆、猪肝的组织匀浆和大鼠的组织匀浆中孵育，因为蛋白结合，苯酚释放的半衰期与在缓冲溶液中一样，或者稍大。

图4 苯酚的碱性氨基甲酸酯通过环合-消除而活化^[13]

2. 基于酸性氨基基团的环合-消除

除了用一个碱性氮进攻,也存在阴离子氮的分子内进攻的可能性,例如,质子化的氨基氮。这用苯酚模型(图5; $X=H, Cl, OCH_3$)^[14]的 *N*-(2-氨基酰苯基)氨基甲酸酯可以证明。在该分子中,去质子的氨基酰基进攻氨基甲酸酯羰基,生成间二氮杂萘二酮并且释放出苯酚。还对 *N*-(2-氨基酰苯基)氨基甲酸酯类在缓冲溶液中和人稀释血浆中的稳定性进行了研究。非酶催化的环合-消除速率对于氨基酰取代的性质(图5中的 R')高度敏感。大于甲基的烷基取代会大大降低反应性,可能是由于立体位阻的影响。相反,由于促进去质子化,吸电子取代增加反应性。总的来说,这些反应是有意义的,因为速率跨越了4个数量级。

在人血浆中,观察到两组化合物。在大多数情况下,在血浆中的反应(例如,化学反应加酶的催化活化)比在

图5 anthranilamides 的苯基氨基甲酸酯分子内环合-消除的简单反应机理^[14]图6 苯酚半酯前药通过质子催化水解的活化(反应a),羟基催化水解(反应b),或环合-消除(反应c)。酶水解没有显示^[15]

缓冲溶液中大约快两倍。这表明了人血浆中酶的水解是最适度的。对于三种没有取代的氨基酰($R=H$)基团的前药,酶反应比分子内催化快好几倍,表明这些化合物是血浆水解酶的底物。因此,*N*-(2-氨基酰苯基)氨基甲酸酯的前一部分可以高度调节分子内活化,并几乎没有酶的活化。

3. 基于羧酸酯或羟基的环合-消除

分子内环合不限于亲核氮(碱性氨基或酸性氨基基团)的攻击,它们也能够被羧酸酯、苯酚或乙醇基团中的亲核氧催化。羧酸基团催化作用在苯酚或对乙酰氨基酚(图6; R 分别是 H 或 $NHCOCH_3$)^[15]的半酯中发现。除了酶的水解,还有三种化学水解机理,即酸催化、碱催化 and 分子内亲核进攻,导致了环合消除(图6,反应a、b和c)。在缓冲溶液中,这三种机理的相对重要性是pH依赖的。在生理pH,环合-消除是主要反应,在37℃时半衰期的范围是1~350min。在这个pH下反应显著地受到分子取代基的长度与程度,以及苯酚的 pK_a 值的影响。因此,丁二酸酯(图6; $X=CH_2CH_2$)的反应性比戊二酸酯($X=CH_2CH_2CH_2$)大约150倍;C-甲基化 [$X=CH_2CH(CH_3)CH_2$]也可以增加反应性。对乙酰氨基酚的酯($R=NHCOCH_3$)降解速率是苯酚酯的两倍($R=H$)。

Q

在大多数情况下,图6中的半酯在人血浆中几乎没有或很少受到酶的作用而降解,这与著名的乙酰胆碱酯酶的半酯惰性相一致。相反,在猪或鼠的肝样本中经常观察到非常快速的水解,表明了涉及(羧酸)酯酶。唯一惰性的化合物是对乙酰氨基酚的3,3-二甲基戊二酸酯[图6; $X=CH_2C(CH_3)_2CH_2$]。获得人肝脏酶水解这类前药的数据非常有意义。

作为分子内亲核试剂苯酚和乙醇中羟基的作用也有潜在的意义。现在介绍这种类型的一个例子^[16]。N-2-羟基苯基氨基甲酸酯(图7)经分子内环合,定量地释放苯酚或乙醇。该途径的意义在于环合产物本身就是一个药物,即骨骼肌弛缓剂氯唑沙宗。在该工作中研究了大量酚和醇,大多数是模型化合物,还包括对乙酰氨基酚。在这种情况下,这种类型的前药释放不是一种而是两种药物,被称作互为前体药物。

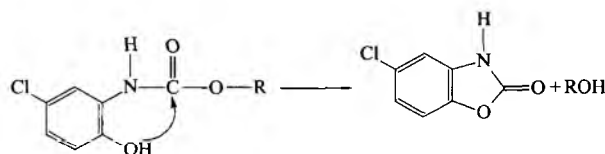


图7 N-2-羟基苯基氨基甲酸酯作为苯酚和苯并唑的潜在前药而环合^[6]

图7中的活化机理被证明是苯酚盐离子分子内亲核进攻羰基基团。因此,反应的速率随着pH线性增加,在pH

8~9的时候达到最高点。影响反应速率的主要因素是释放的ROH酸性,pH 10和25℃条件下 $t_{1/2}$ 的范围从ROH=CH₃CH₂OH(pK_a 16.0)的290天到ROH=苯酚(pK_a 9~10)的3~12s。在pH 7.4和37℃^[16]的条件下 $t_{1/2}$ 的值是7.1s。也检测了图7中一些前药或互为前体药物在人或鼠血浆中的稳定性^[16]。这些N-2-羟基苯基氨基甲酸酯在人或鼠血浆中的 $t_{1/2}$ 是在缓冲溶液中的2~3倍,表明没有酶的水解作用,中等的稳定性取决于与血浆蛋白的结合。

前药研究中的一些问题

前药相对于活性药物带来的益处值得思考。概括说,大量的文献数据表明,当开发一个新的有前途药物由于药动学和制剂上的缺陷而受到阻碍时,采用前药策略可以克服该阻碍。相反,当药物的缺陷可以接受,或转化成前药时仅有少许改进时,获得的益处可以忽略。但是在设计和开发前药的过程中究竟有什么特殊的困难?表3概括列出了这些困难^[17],还可以加上可能出现的注册困难。

因此,难怪许多药物化学家都对前药持批评态度。然而,并且这只是我们的结论,一个清晰的见解不能忽略潜在的益处,在这种情况下,起码存在一些成功的前药。蔡丁美酮、奥司他韦和匹氨西林等只是少数几个涌上脑海的例子。在大量事例中它们证明了前药的设计的确可以分别优化PK和PD性质。

表3 前药设计和开发中的特殊困难

目标	策略	局限
减少建议的候选物数量 开拓理化和PK性质的最大空间 减少附加的合成工作	基于目标理化和PK性质的预测仔细设计前药	现有局部的定量模型 全局的定性模型(如5条规则) 全局的定量模型
实现目标理化特性 实现目标PK特性	仔细地权衡得失 高通量理化特性的虚拟筛选	附加的费用和努力难以接收 一些HTP技术的不确定性 一些模型预测能力的不确定性
实现目标代谢行为,特别是活化的目标速率 缺少前药或片断的毒性数据	快速的体外代谢评估 基于知识设计的毒性筛选	不全面的知识 体内筛选的不确定性

参考文献

- Testa, B.; Caldwell, J. Prodrugs Revisited—The Ad Hoc Approach as a Complement to Ligand Design. *Med. Res. Rev.* 1996, 16, 233–241.
- Oxford, J. S.; Lambkin, R. Targeting Influenza Virus Neuraminidase—a New Strategy for Antiviral Therapy. *Drug Discov. Today* 1998, 3, 448–456.
- Stella, V. J.; Charman, W. N. A.; Naringrekar, V. H. Prodrugs: Do They Have Advantages in Clinical Practice?

Drugs 1985, 29, 455–473.

- Wermuth, C. G. Designing Prodrugs and Bioprecursors. *Drug Design: Fact or Fantasy?*; Jolles, G., Woolridge, K. R. H., Eds.; Academic Press: London, 1984; 47–72.
- Riley, R. J.; Workman, P. Enzymology of the Reduction of the Potent Benzotriazine-di-N-oxide Hypoxic Cell Cytotoxin SR 4233 (WIN 59075) by NAD(P)H: (Quinone Acceptor) Oxidoreductase (EC 1.6.99.2) Purified from Walker 256 Rat Tumour Cells. *Biochem. Pharmacol.* 1992, 43, 167–174.

6. Bodor, N. Redox Drug Delivery Systems for Targeting Drugs to the Brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1987, 507, 289—306.
7. Duncan, R. Drug-Polymer Conjugates: Potential for Improved Chemotherapy. *Anti-Cancer Drugs* 1992, 3, 175—210.
8. Testa, B.; Mayer, J. M. Design of Intramolecularly Activated Prodrugs. *Drug Metab. Rev.* 1998, 30, 787—807.
9. Chan, S. Y.; Li Wan, PoA. Prodrugs for Dermal Delivery. *Int. J. Pharmaceut.* 1989, 55, 1—16.
10. Hwang, I. Y.; Elfarra, A. A. Cysteine S-Conjugates May Act as Kidney-Selective Prodrugs: Formation of 6-Mercaptopurine by the Renal Metabolism of S- (6-puriny) -LCysteine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989, 251, 448—454.
11. Shan, D.; Nicolaou, M. G.; Borchardt, R. T.; Wang, B. Prodrug Strategies Based on Intramolecular Cyclization Reactions. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86, 765—767.
12. Saari, W. S.; Schwering, J. E.; Lyle, P. A.; Smith, S. J.; Engelhardt, E. L. Cyclization-Activated Prodrugs. Basic Esters of 5-Bromo-2-Deoxyuridine. *J. Med. Chem.* 1990, 33, 2590—2595.
13. Thomsen, K. F.; Strøm, F.; Sforzini, B. V.; Begtrup, M.; Mørk, N. Evaluation of Phenyl Carbamates of Ethyl Diamines as Cyclization-Activated Prodrug Forms for Protecting Phenols Against First-Pass Metabolism. *Int. J. Pharma.* 1994, 112, 143—152.
14. Thomsen, K. F.; Bundgaard, H. Cyclization-Activated Phenyl Carbamate Prodrug Forms for Protecting Phenols Against First-Pass Metabolism. *Int. J. Pharma.* 1993, 91, 39—49.
15. Fredholt, K.; Mørk, N.; Begtrup, M. Hemiesters of Aliphatic Dicarboxylic Acids as Cyclization-Activated Prodrug Forms for Protecting Phenols Against First-Pass Metabolism. *Int. J. Pharma.* 1995, 123, 209—216.
16. Vigroux, A.; Bergon, M.; Zedde, C. Cyclization-Activated Prodrugs; N- (Substituted 2-Hydroxyphenyl and 2-Hydroxypropyl) Carbamates Based on Ring-Opened Derivatives of Active Benzoxazolones and Oxazolidinones as Mutual Prodrugs of Acetaminophen. *J. Med. Chem.* 1995, 38, 3983—3994.
17. Testa, B.; Mayer, J. M. Concepts in Prodrug Design to Overcome Pharmacokinetic Problems. *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research—Biological, Physicochemical and Computational Strategies*; Testa, B., van de Waterbeemd, H., Folkers, G., Guy, R., Eds.; Wiley—VCH: Weinheim, in press.
18. Balant, L. P.; Doelker, E. Metabolic Considerations in Prodrug Design. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*; 5th Ed., Wolff, M. E. Ed.; Wiley: New York, 1995; 1, 949—982.
19. Borchardt, R. T.; Repta, A. J.; Stella, V. J., Eds. *Directed Drug Delivery—A Multidisciplinary Approach*, Humana Press; Clifton NJ, 1985.
20. Bundgaard, H.; Hansen, A. B.; Kofod, H., Eds. *Optimization of Drug Delivery*, Munkgaard; Copenhagen, 1982.
21. Bundgaard, H. A Textbook of Drug Design and Development; Krogsgaard-Larsen, P., Bundgaard, H., Eds.; Harwood; Reading, 1991; 113—191.
22. Harper, N. J. Drug Latentiation. *Progress in Drug Research*; Jucker, E., Ed.; Birkhäuser; Basel, 1962; 4, 221—294.
23. Testa, B.; Jenner, P.; *Drug Metabolism: Chemical and Biochemical Aspects*; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1976.
24. Testa, B.; *The Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics—Biochemistry of Redox Reactions*; Academic Press; London, 1995.
25. Testa, B. *Drug Metabolism. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*; 5th Ed.; Wolff, M. E., Ed.; Wiley: New York, 1995; 1, 129—180.
26. Testa, B.; Mayer, J. M.; *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism—The Biochemistry and Enzymology of Hydrolases*; Wiley—Verlag Helvetica Chimica Acta; Zurich, in preparation.
27. Widder, K. J.; Green, R., Eds. *Drug and Enzyme Targeting (Methods in Enzymology)*; Academic Press; Orlando, FL, 1985; 112.

(王国平 侯建译)



Q

潜溶剂和潜溶

Joseph T. Rubino

Wyeth-Ayerst Research, Pearl River, New York, U. S. A.

引言

潜溶剂是指在液体药物处方中为提高水溶性差的物质的溶解度或提高药物的化学稳定性而加入的与水可混溶的有机溶剂。潜溶是指为特定目的使用潜溶剂的技术,通常也指混合溶剂。潜溶已成为药物处方设计历史中一种制备液体药物制剂的方法。某些来源于植物的药物水溶性很差,因此为了在小容量的制剂中传输足够剂量的药物需要水和乙醇混合物的处方。含有潜溶剂的处方类别中普通的一个例子是酞剂,它是一种口服有甜味的含水乙醇溶液。另一个典型的例子是酞剂,通常含有更高含量的乙醇。特别是随着治疗药物结构复杂性的增加,在口服、注射和局部使用的溶液新药处方设计中,潜溶剂的需求量依然很大。

在大多数情况下,潜溶剂能将非极性药物的溶解度提高到高出水中溶解度几个数量级。这将非常重要。例如,一个处方设计的难题是要求将药物的溶解度提高 500 倍或更大。使用潜溶剂制备非极性药物的溶液是获得药物高浓度的一种简单和可能有效的方法。

潜溶剂主要的缺点包括潜溶剂潜在的生物学效应,以及使用潜溶剂增溶的药物可能会在水性液体的稀释过程中发生沉淀。如果潜溶剂具有这些生物学效应,包括一般毒性、靶器官毒性、组织刺激性或影响生物膜渗透张力,可能就会限制或取消其药物处方中的使用。

其他考虑因素包括黏度、张力和味道,以及对处方中除主药外其他组分的溶解度和稳定性的影响。当用于提高药物的化学稳定性时,潜溶剂可能通过一种或两种机制产生作用。如果药物容易水解,潜溶剂通过在处方中代替部分或全部的水来减少药物的降解。另一种机制是,如果过渡态比反应物本身的极性更大,潜溶剂通过产生不适于过渡态的环境可以提高药物的稳定性^[1]。

潜溶剂的增溶作用

1. 方法和理论

1.1 溶解度和溶剂的极性

固体非电解质溶质在任一溶剂中的溶解度,可以用式(1)表示如下:

$$\log X = \frac{-\Delta H_f}{2.303RT_m} (T_m - T) - \log y \quad (1)$$

式中: X 为溶质的摩尔分数溶解度; ΔH_f 为摩尔熔化热;

R 为摩尔气体常量; T_m 为溶质的熔点; T 为温度; y 为活度系数。式(2)给出了活度系数的表达式为

$$\log y = C_{11} + C_{22} - 2C_{12} \quad (2)$$

式中: C_{11} 为溶剂的内聚能; C_{22} 为溶质(药物)的内聚能; C_{12} 为附着能,通常将 C_{12} 作为 C_{11} 和 C_{22} 的函数来进行计算。例如,当色散力为

$$C_{12} = (C_{11}C_{22})^{1/2} \quad (3)$$

$\log y$ 的值越大,药物的溶解度越小,由内聚力和附着力控制着 y 值的大小。对于水中的疏水药物,与 C_{22} 和 C_{12} 相比 C_{11} 的值很大。因此,由于水的内聚能大以及水与药物的相互作用能小,从而使溶解度很小。在理想溶液中,所有的分子间作用力是相等的,即

$$C_{11} = C_{22} = C_{12}$$

且

$$\log y = 0$$

尽管药物溶液很少是理想溶液,但潜溶的目的就是通过改变溶剂的极性而使溶液接近理想溶液。通过加入一种有机潜溶剂来替代部分水,使 C_{11} 的值与 C_{22} 值接近,同时导致这两个因素的值与 C_{12} 值更相似。 $\log y$ 的值减小,从而提高了溶解度。当溶剂与溶质的分子间作用力和溶质与溶质的分子间作用力相等时,溶质的溶解度达到最大值。因此,通过这样的分析我们可以理解“相似相溶”这种说法了。在某些情况下,溶质与溶剂之间的强极性或电荷转移作用可以产生比理想溶液更大的溶解度。由于 C_{12} 值相对大会导致 $\log y$ 是个负值,但这种情况通常不会发生。

为了估测溶质的溶解度,有必要对溶质或溶剂的极性进行测定。根据式(1)和式(2),有用的极性指数应该是度量材料分子间的作用力,即 C_{11} 和 C_{22} 。表 1 列出了液体药剂处方中常用的溶剂及其极性的三种测量结果。每个溶剂极性的测量结果,或者极性指数都是基于材料特性的不同量度。例如,介电常数是一种衡量溶剂电绝缘性能的参数,溶解度参数是由摩尔气化能确定的,而界面张力是一种衡量溶剂-油界面二维黏着力参数。因为溶解度参数和界面张力与分子间黏着力相互作用关系密切,因此它们经常用于各种理论解释和预测在混合溶剂中的溶解度。尽管测定方法可能不同,但不同溶剂的极性强弱次序通常是一致的。因此,不管考虑哪个极性指数,水和甘油与乙醇或聚乙二醇(PEG)相比,其极性更强。已经发展了测定极性或溶剂与溶剂间的分子作用力的其他方法,即测定氢键给予和接受的能力,如 Taft 和 Kamlet 的 α 值和 β 值^[2,3],以及估测色散力、极性及氢键合力的三维溶解度参数等^[4,5]。

表 1 潜溶剂及其极性指标

潜溶剂	介电常数 ¹⁾ ϵ	溶解度参数 δ / (cal/mL)	界面张力 ²⁾ / (dyn/cm)
水	78.5	23.4	45.6
甘油	42.5	17.7	32.7
N, N-二甲基乙酰胺	37.8	10.8	4.6
丙二醇	32.0 (30°C)	12.6	12.4
乙醇	24.3	12.7	0.5
聚乙二醇	13.6	11.3	11.7
二甲基异山梨醇	—	8.63	4.2

1) 除了另外说明所有的值都是在 25°C 条件下测定的。

2) 相对于液体石蜡测定。

认识到对溶剂极性的讨论仅仅当考虑某种特殊溶质时才是有用的, 这是很重要的。因此, 对于中性溶质如茶碱来说, 纯乙醇可能被认为是非极性的。但对于一个相对非极性的溶质, 如氢化可的松, 乙醇可能被认为是中极性的, 图 1 解释了这种概念。随着溶剂极性的增加, “非极性”和“极性”溶质的溶解度会各自不断地减少或增大。“中性”溶质的溶解度在某一中等溶剂极性时达到最大。需要指出的是, 相反的观点 (例如, 应相对于溶剂极性讨论溶质极性) 也是有根据的。

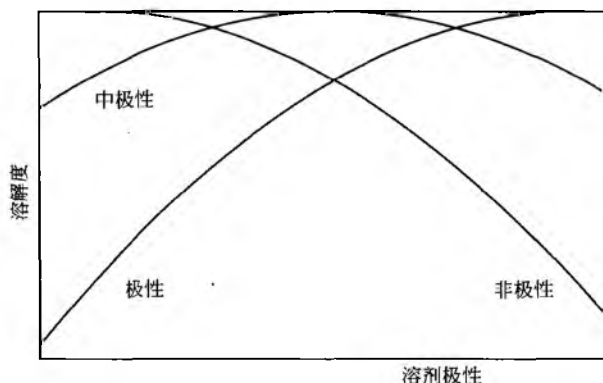


图 1 极性、中性以及非极性溶质的溶解度与溶剂极性的关系

由于氢键溶液 (如应用于制药中的那些溶液) 分子间相互作用的复杂性, 没有一个单一参数能够定量所有的相互作用。发展了几个理论用来估测药物在潜溶剂-水混合液中的溶解度。根据溶解度估测要求的精确度, 由这些理论推导出了从相对简单到复杂的关系。以下部分给出了选择合适溶剂的一些理论和指导原则。

1.2 评估溶剂组分

选择溶剂组分的最直接方法是对可接受的制药溶剂进行反复实验。在多数情况下, 由于这些制药溶剂数量相对有限, 使用这种方法能够成功获得药剂处方。这种试验方法虽然对获得单一溶剂中的溶解度信息很有用, 但要求混合不同的溶剂时就非常麻烦了。

采用和均法根据有限的实验处方或溶解度数据重新设计溶剂的处方, 改进了纯经验方法。Moore^[6]报道了一种使

用介电常数几乎为 1 的纯或混合溶剂重新设计溶剂处方的方法。例如, 通过实验发现含 50% 乙醇的水溶剂能够溶解所要求的药量。在一些应用中, 可能要求用丙二醇-水重新设计溶液的处方。首先必须利用表 1 给出的乙醇和水的介电常数计算 50% 乙醇水溶液的近似介电要求 (ADR)。

$$0.50 \times 78.5 + 0.50 \times 24.3 = 51.4$$

假定介电常数为 51.4 的任何溶剂能够溶解同样多给定的药物。通常, ADR 可以按以下公式计算:

$$ADR = \sum_{i=1}^n \frac{(\% \text{ solvent}_i \epsilon_i)}{100}$$

为了计算处方中需要的丙二醇和水的数量, 可以采用和均法, 即

$$\begin{array}{r} 78.5 \quad 19.4 \\ 51.4 \\ 32.0 \quad 27.1 \\ 46.5 \end{array}$$

因此, 需要的丙二醇的体积分数为 $(27.1/46.5) \times 100 = 58.3$ 。另外, 可以使用一种代数方法, 即通过联立溶液的平衡方程式来计算新潜溶剂的体积分数 (‰); 然而, 当处方中含有超过 1 种潜溶剂时, 和均法相对简单一些。当第一次在处方中加入一种溶剂的时候, 有必要通过实验来确定某些潜溶剂的浓度以维持溶液中所需要的药物浓度。该值可用于计算 ADR 和按前面解释的方法计算获得最终的溶剂。

对于一个给定溶质, 使用 ADR 方法不可能总会提供精确的溶剂组成, 因为分子间作用力依赖于溶质和溶剂的结构特点, 而 ϵ 不能表现出溶质和溶剂的结构特点^[7,8]。因此, 当混合溶剂时, 可能或有必要用潜溶剂极性的其他量度, 如溶解度参数、表面或界面张力等替代 ϵ , 尽管溶剂预测的不准确性通常还会继续存在。

Yalkowsky 等^[9]开发了另一种相对简单的方法来评估药物在潜溶剂-水混合溶液中的溶解度。这种方法是根据实验的观察而设计的, 即随着潜溶剂-水混合溶液中潜溶剂体积分数 f 的增大, 非极性溶质的溶解度成指数增长。

$$\log S_m = S_w + \sigma f \quad (4)$$

式中: S_m 为药物在潜溶剂-水混合溶剂中的溶解度; S_w 为药物在水中的溶解度; σ 为 $\log S_m$ 对 f 曲线的斜率。图 2 解释了这种关系。式 (4) 适用于随着潜溶剂的含量从 0%~

100%，溶质的溶解度连续增大或连续减小的情况。也就是说，该公式对中性溶质不适用，因为在潜溶剂含量从0%~100%之间其溶解度会有一个最大值。因此，对非极性或极性溶质，可以由药物在水中和在潜溶剂中的溶解度数据来评估它在潜溶剂-水混合溶剂中的溶解度，分别将这些点画在 $f=0$ 到 $f=1$ 的溶解度半对数图上，用一条直线连接这些点。

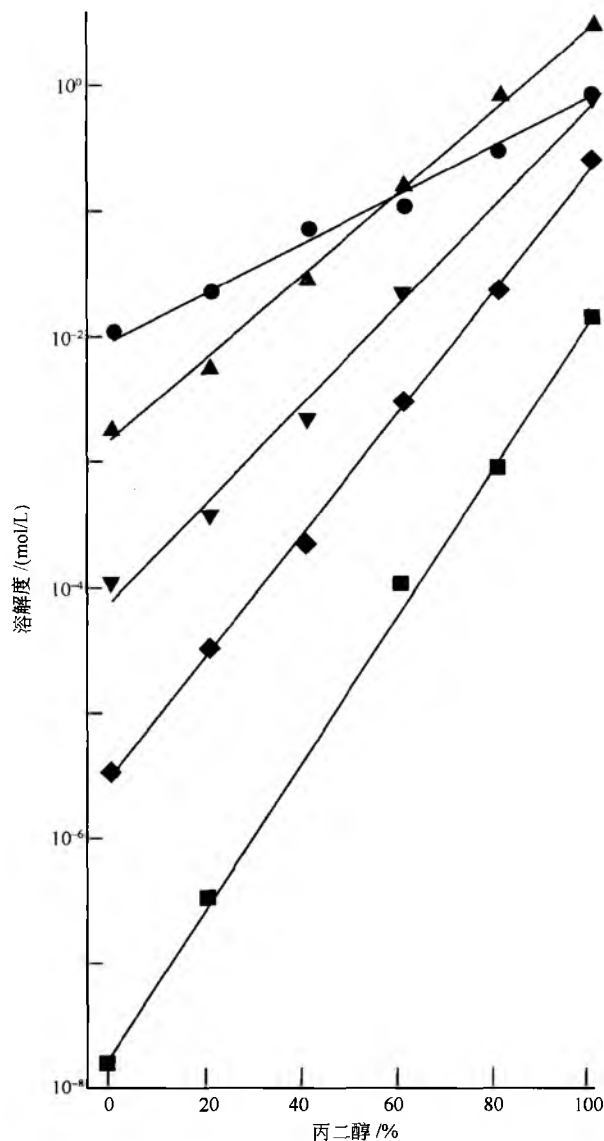


图2 一系列烷基 *p*-氨基苯甲酸酯在丙二醇-水中的溶解度与丙二醇百分含量的对数线性关系^[9]

另外的研究表明，对于特定的潜溶剂-水组合使用溶质的辛醇-水分配系数 $\log P$ 作为溶质极性的指数可以估计 σ 。

因此，对于丙二醇-水混合溶液^[10,11]，则有

$$\begin{aligned}\sigma &= 0.714 (\log P) + 0.714n = 382 \\ r^2 &= 0.962, s = 0.325\end{aligned}\quad (5)$$

对于乙醇-水混合液^[12]①，则有

$$\begin{aligned}\sigma &= 0.903 (C \log P) + 0.402n = 107 \\ r^2 &= 0.955, s = 0.567 \quad \delta_1 = \sum_{i=1}^n \delta_i f_i\end{aligned}\quad (6^*)$$

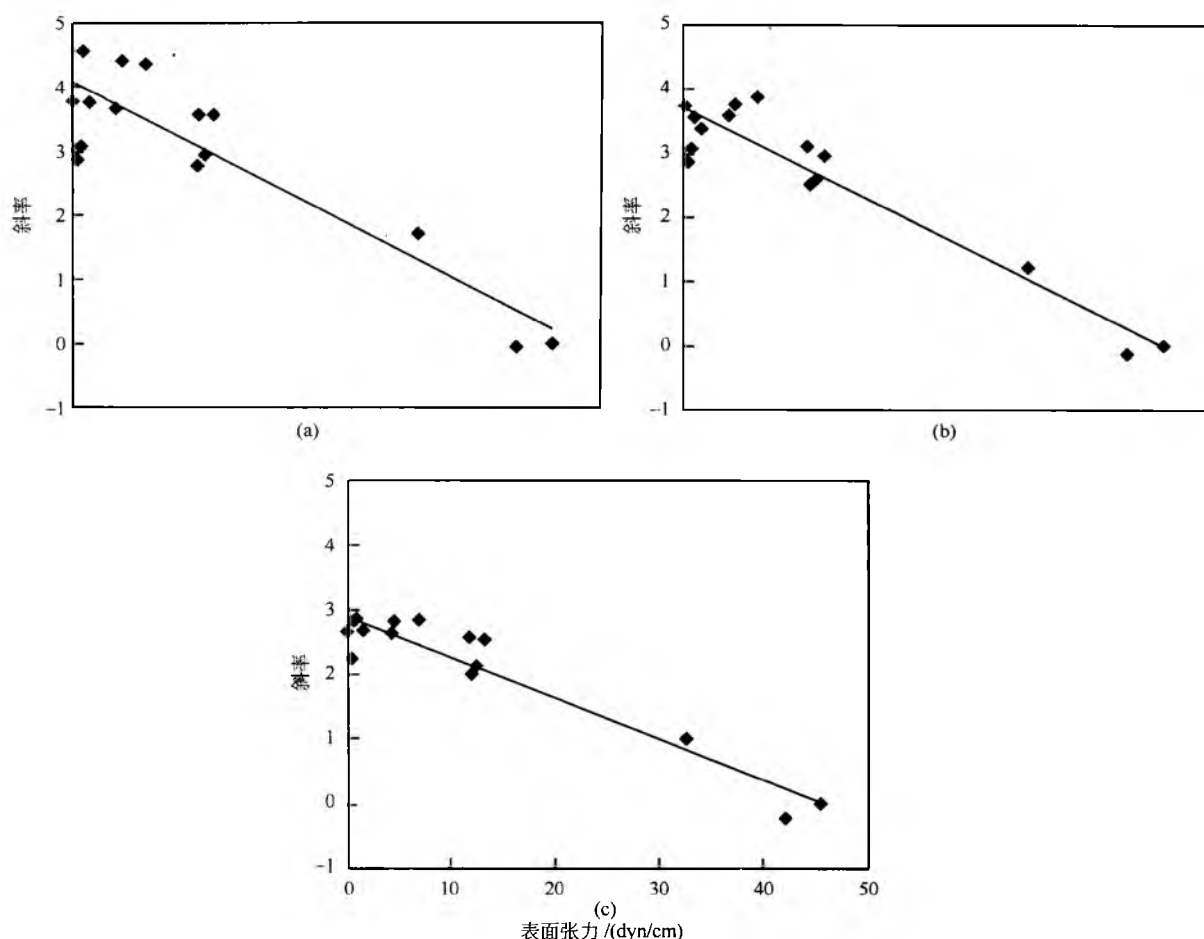
这些公式说明了一个规则，对特定的潜溶剂-水混合溶液，溶质的亲脂性越强，式(4)中的斜率越大。也就是说，溶质的 $\log P$ 值越大，相对于水的溶解度增大得就更大。一般来说，如果溶质的 $\log P \geq 2$ ，那么它在大多数制药溶剂中将表现为非极性， S_m 将随着 f 的增大而连续增大。

另外，Rubino 和 Yalkowsky^[13] 发现，对于给定的溶质， σ 是潜溶剂极性的线性函数。图3解释了三种亲脂性化合物苯妥英、地西洋和苯佐卡因的这种关系。因此，使用期望的潜溶剂极性指数采用内推法估计 σ ，需要有给定药物在水以及至少两种潜溶剂中的溶解度数据。这些研究允许将式(4)作为处方研究中一种基于有限的实验溶解度数据和平常获得的溶质及溶剂极性指数合理选择或去除潜溶剂的方法。

式(4)~式(6)给出了近似溶解度数据，在许多情况下，其可作为选择潜溶剂以及减少实验工作的辅助工具。使用这些关系获得的可变处方，很可能需要通过实验进一步进行修改。跟 ADR 方法一样，并不是所有的分子间作用力都可以用式(4)~式(6)中的简单关系来说明。例如，实验得到的溶解度数据通常与式(4)估计的线性关系有所偏离^[14]。同时必须记住，式(4)~式(6)适用于非电解质或未电离的弱电解质。用这些关系式是无法对盐和离子化合物的行为进行可靠评估的。

Williams 和 Amidon^[15~17] 研究了一种方法，将溶剂-溶剂和溶质-溶剂相互作用引入到基本的对数线性表达式。在他们的方法中，潜溶剂-水的相互作用是由溶剂混合液的蒸气压数据来估计的。这些数据可从文献中获得，或者通过实验进行测定。用实验溶解度数据来估计溶剂-溶质相互作用。另外一种方法，如 Khossrav 和 Connors^[18] 所描述的，将溶解自由能分成晶体、空位和溶剂化物。与晶体有关的自由能由溶质的熔化焓估计，与空腔形成有关的自由能由溶剂表面张力数据和溶质分子表面积来估计。溶剂化组分的自由能由一种假定溶质、水和潜溶剂之间存在的一系列竞争交换平衡的模型得到。通过回归分析实际的溶解度数据可得到这些平衡常数。前面描述的这些方法可能在描述混合溶剂体系的溶解度方面更准确，但其需要一个或多个模型参数。这些参数通常是一个特殊的溶质-溶剂体系所特有的，并且必须要通过实验数据来进行估计。

① $C \log P$ 是一个计算值。式(5)中的 $\log P$ 值通过实验或从文献中获得。

图3 斜率与用溶剂表面张力表示的溶剂极性的关系^[18]

(a) 苯妥英; (b) 地西洋; (c) 苯佐卡因

另外一种理解和预测混合溶剂中的溶解度的方法是基于式(1)估计的活度系数 $\log y$ 。Martin 及其合作者^[19, 20]对 Hildebrand 和 Scott^[21]提出的普通溶液理论的应用进行了研究,以预测有机溶质在不同溶剂混合液中的溶解度。

$$\log y = \frac{V_2 \phi_1^2}{2 \cdot 303RT} (\delta_1 - \delta_2)^2 \quad (7)$$

式中: V_2 为溶质的摩尔体积; ϕ_1 为溶剂的体积分数; δ_1 和 δ_2 分别为溶剂和溶质的溶解度参数。对混合溶剂有

$$\delta_1 = \sum_{i=1}^n \delta_i f_i$$

式中: f_i 为溶剂 i 的体积分数。当 $\delta_1 = \delta_2$ 时, $\log y$ 等于 0, 此时溶液是理想溶液。对于有机溶剂混合物, 只有当溶质和溶剂的极性相近的时候, 式(7)获得的溶解度与实验获得的溶解度才有很好的一致性。此外, 由于普遍存在强极性和强氢键作用, 作为药物剂型的溶液很少是真正的普通溶液。因此, 式(7)在溶液制剂中的应用受到了限制。

为了说明极性和氢键作用, Martin 等^[22, 23]提出了扩充的 Hildebrand 公式, 即

$$\log X = \frac{-\Delta H_f}{2 \cdot 303RT} \left(\frac{T_m - T}{T_m} \right) - \frac{V_2 \phi_1^2 (\delta_1^2 + \delta_2^2 - 2W)}{2 \cdot 303RT} \quad (8)$$

其中 W 是用来说明较强溶质-溶剂相互作用的因素, 如氢键和偶极力。对于给定的溶质, 通过对溶解度数据进行回归分析可以确定 W 值。因此, 必须建立每种溶质的溶解度数据库。此外, 如果可以很容易找到不同溶剂的溶解度参数, 则必须通过实验来确定或通过计算来估计对某一个溶质的溶解度参数。

估计活度系数的另一种方法考虑到了溶质与溶剂之间的界面张力。Amidon 等^[24]报道了用这种方法估计有机溶质在水中的溶解度, 即

$$\log y = \frac{A_2 \gamma_{12}}{2 \cdot 303RT} \quad (9)$$

式中: A_2 为溶质的分子表面积; γ_{12} 为溶质-溶剂界面张力。

Yalkowsky 等^[25]发展了用于混合溶剂体系的方法, 即

$$\log X_m = \log X_w + \frac{[C(\gamma_{wh} - \gamma_{ch}) A_h] f}{2 \cdot 303RT} \quad (10)$$

式中: X_m 为潜溶剂-水混合液中的摩尔分数溶解度; X_w 为

水中的摩尔分数溶解度； γ_{wh} 和 γ_{ch} 分别为溶质-水和溶质-潜溶剂的界面张力； A_h 为溶质的疏水表面积； C 为校正分子界面和宏观界面差异的经验值^[26]。该表达式中的专业术语 γ 是宏观测定的水-正十四烷和潜溶剂-正十四烷的界面张力。不同溶剂体系中每种溶质的 C 是一个常数，可通过实验测定^[26,27]。 A_h 通过计算机程序测定或通过组合贡献的方法获得。如式 (10) 所预测的，当加入潜溶剂使溶质与溶剂的界面张力减小时，相对于纯水的溶解度增大。可以发现，式 (4) 和式 (10) 存在着相似之处，这为式 (4) 提供了进一步的理论基础。

使用界面张力作为一种溶质-溶剂相互作用的衡量标准，其优点是可以测量分子间力差异很大的物质的界面张力，因而对估计高度“不规则”体系的溶解度是非常有用的。相反，当溶质与溶剂极性相似且无法测定界面张力时，可以使用普通溶液的测量方法。

2. 稀释含有潜溶剂作为增溶剂的处方

式 (4) 预测，随着潜溶剂体积分数的增大，非极性化合物的溶解度成指数增大。然而，用水性介质，如血液或静脉输液稀释潜溶剂增溶的制剂，可能会发生相反的现象，即溶解度成指数下降。必须同时考虑稀释后药物浓度的改变，药物的浓度只是随稀释成线性降低。图 4 显示了这种影响^[11]。直线 A 和直线 B 表示在两种不同潜溶剂-水体系中以潜溶剂浓度为变量的药物的溶解度。曲线表示在不同稀释程度下药物的浓度。当药物的浓度曲线与溶解度曲线相交时，会发生沉淀。对体系 A 中药物的三种浓度，可以预期当稀释到潜溶剂浓度约为 30% 的点时，浓度 III 会发生沉淀。药物初始浓度较小的处方 I 和处方 II 与直线 A 不相交，因此在稀释过程中它们是稳定的。另外，溶解度曲线斜率大的加入潜溶剂或溶剂混合物中的药物处方（直线 B）在稀释过程中也可能会减少沉淀。在这种情况下，即使是浓度 III 在稀释过程中也不会发生沉淀。因此，精心选择潜溶剂和药物浓度能够避免在静脉注射或用水性液体稀释过程中出现沉淀。

潜溶剂的生物学效应

选择潜溶剂作为药物处方的溶剂时，必须要考虑溶剂或溶剂混合液与适当组织的兼容性，同时也要考虑潜在的全身效应。当加入相对大剂量的潜溶剂作为部分药物溶剂时，偶尔会有对人类的中枢神经系统（CNS^[28]）或肾脏系统^[29]的全身效应的报道。通常，在药物的药理或安全性评价过程中，当使用含有潜溶剂的药物处方给动物投药时，潜溶剂的全身效应会受到特别的关注。Budden 等^[30]证实，一些常用潜溶剂对老鼠的中枢神经系统和肌肉具有弛缓作用。必须记住，潜溶剂的不良生物学影响取决于几个因素，其包括潜溶剂的剂量、给药途径、给药速度以及处方中的浓度。例如，单次快速注射含有潜溶剂的处方会导致不良的影响，可以通过缓慢给药或在给药前使用等张溶液稀释

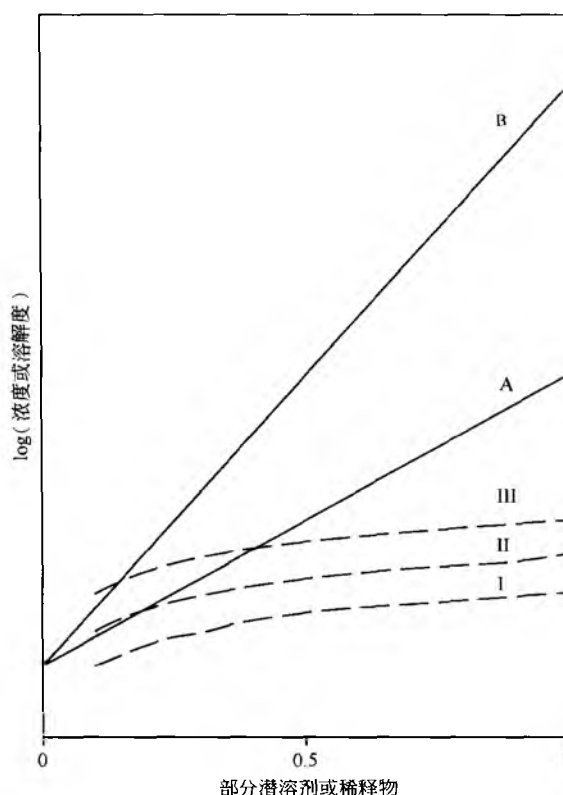


图 4 水性介质的稀释对潜溶剂增溶处方的影响图示（解释见正文）

减少或去除。当一种特殊的潜溶剂存在不良的全身或局部效应而限制了它在处方中的使用时，应妥善换用另一种潜溶剂来进行溶剂的混合。

表 2 列出了不同潜溶剂对小鼠和大鼠的 LD_{50} 数据，表 3 列出了不同潜溶剂局部用于皮肤或眼睛的刺激性数据。另外，产品开发人员依赖于过去或目前市场上的药物处方作为新药处方的安全性指导。表 4~表 6 给出了含有潜溶剂的不同药品的成分，包括用于注射、局部、眼内和耳内的药品。

表 2 不同潜溶剂对小鼠和大鼠的 LD_{50} 数据^[48]

潜溶剂	$LD_{50}/(mg/kg)$					
	小鼠			大鼠		
	Oral	IV	IP	Oral	IV	IP
乙醇	7800	1973	1230	7060	1440	4070
丙二醇	24 000	8000	9718	20 000	6800	6660
甘油	4090	6199	8982	126 000	5566	8728
PEG 400	28 915	8550	9953	—	7312	9708
二甲基乙酰胺	4620	3020	2800	5000	2640	2750
二甲基亚砜	16 500	5750	2500	17 500	5360	8200

表 3 选择的潜溶剂的刺激性数据^{1)[48]}

潜溶剂	皮肤	种类	眼	种类
乙醇	400 mg (非闭合的)	家兔	79 mg	家兔
丙二醇	10% (2 天)	人类	100 mg (温和)	家兔
	500 mg (7 天, 温和)	仓鼠	500 mg (中等)	家兔
甘油	500 mg (中等)	家兔	126 mg (温和)	家兔
二甲基乙酰胺	10 mg (温和)	家兔		
二甲基亚砜	10 mg (非闭合的, 温和)	家兔	100 mg	家兔
	500 mg (中等)			
异丙醇	500 mg (温和)	家兔	16 mg; 10 mg (中等)	家兔

1) 数据为应用 24h (除非另有说明) Draize Test 获得的最小刺激剂量。表中列出了反应的严重性。所有的试验均在闭合的皮肤上进行, 除非另有说明。

潜溶剂在静脉注射和肌肉注射过程中的局部效应获得了相当多的关注。一些调查研究了潜溶剂的溶血可能性^[31-35]。已研究了静态和动态流动条件下潜溶剂引起的红细胞溶血现象。表 7 来自 Krzyzaniak 等^[35]的研究, 将含有潜溶剂的不同溶剂在体外静态和动态溶血实验的结果与观察到的体内溶血发生率进行了比较。在另一种刊物中, 描述了一种溶血检测的动态法, 观察到甘油和丙二醇都能产生明显的溶血, 而乙醇和 PEG 400 不溶血^[34]。四种潜溶剂都是在 50% 浓度的水溶液中进行测定。后来报道丙二醇在其浓度低于 20% 时不发生溶血^[35]。

已发现一些难溶性药物的潜溶剂-水混合液处方能导致静脉炎。在家兔耳内注射后, Ward 等试验了几种水溶性和水不溶性药物以及不同的潜溶剂-水混合液处方^[36]。仅潜溶

剂-水溶剂不会导致静脉炎。这些研究说明, 刺激性可能是由与水不混溶的药物所引起的。

肌肉注射之后应考虑潜溶剂对肌肉的局部影响。Brazeau 和 Fung^[37]研究了不同潜溶剂对肌肉的损伤效应。图 5 解释了研究结果。通常, 甘油 (没显示) 和丙二醇有更多的引起肌肉损伤的证据, 而 PEG 400 引起的刺激性最小。这些结果与潜溶剂的溶血可能性相似。Oshida 等^[38]建议根据溶血测定结果预测不同处方的肌肉损伤程度。Brazeau 和 Fung 发现, 将 PEG 400 与其他刺激性较强的潜溶剂混合使用可以减小刺激性强的潜溶剂对肌肉的损伤。

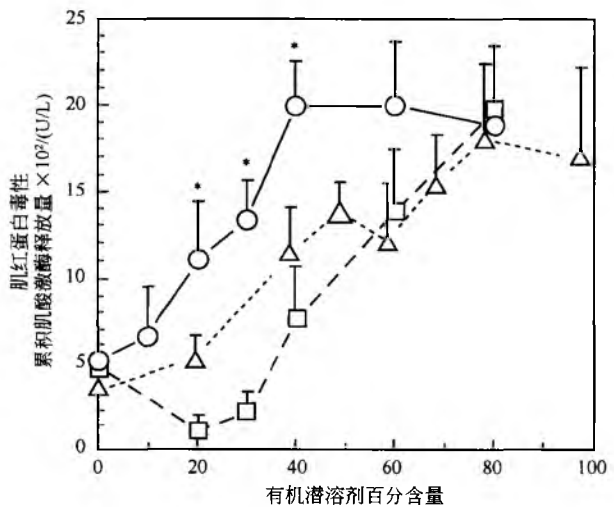


图 5 以水中潜溶剂的百分含量为自变量, 不同潜溶剂的肌红蛋白毒性^[37]。○丙二醇; △乙醇; □PEG 400

已建议其他的潜溶剂, 如甘油甲醛水溶液、丙酮缩甘油、二甲基乙酰胺和二甲基亚砜作为药物处方的可能潜溶剂。然而, 还没有确立它们的安全性。为了获得这些以及其他潜溶剂的更多信息, 建议读者参考 Spiegel 和 Noseworthy 的综述^[39]。

表 4 含有潜溶剂的注射剂产品清单^[49]

商品名	通用名	生产商	潜溶剂	给药途径
BiCNU	卡莫司汀	Bristol Myers	100% 无水乙醇	IV 滴注
Librium	氯氮草	Roche	20% 丙二醇	IM
Sandimmune	环孢菌素	Novartis	聚氧乙烯蓖麻油 65% 乙醇 27.8%	IV 滴注
Valium	地西洋	Roche	丙二醇 40% 乙醇 10%	IM, IV
Lanoxin	地高辛	Glaxo Wellcome	丙二醇 40% 乙醇 10%	首选 IV
Dimenhydrinate	茶苯海明	Steris	丙二醇 50%	IM
Ergotrate Maleate	马来酸麦角新碱	Lily	乳酸乙酯 10%	IV (按需要稀释)
Brevibloc 250 mg	盐酸艾司洛尔	Ohmeda	丙二醇 25% 乙醇 25%	IV

Q

续表

商品名	通用名	生产商	潜溶剂	给药途径
Amidate	依托咪酯	Abbott	丙二醇 35%	IV
VePesid	依托泊苷	Bristol Myers Squibb	PEG300 65% 乙醇 30.5%	IV 滴注
Hydralazine HCl	肼屈嗪	Solopak	丙二醇 10%	IM, IV
Toradol	酮咯酸氨丁三醇	Syntex	乙醇 10%	IM
Ativan	劳拉西泮	Wyeth-Ayerst	PEG 400 18%	IM
			丙二醇 80%	IV (按需稀释)
Alkeran	美法仑	Glaxo Wellcome	丙二醇 60% 乙醇 5%	IV
Nitrobid	硝酸甘油	Abbott, Hoerchst Marion Roussel	丙二醇 45% 乙醇 70%	IV 滴注
Taxol	紫杉醇	Bristol Myers Squibb	聚氧乙烯蓖麻油 EL 52.7% ethanol 49.7%	IV 滴注
Nembutal	戊巴比妥	Abbott	丙二醇 40% 乙醇 10%	IM, IV
Luminal	苯巴比妥钠	Sanofi Winthrop Elkins Sinn	丙二醇 67.8% 乙醇 10%	IM, IV
Dilantin	苯妥英	Parke Davis	丙二醇 40% 乙醇 10%	IM, IV
Secobarbital	司可巴比妥	Wyeth-Ayerst	PEG 400 50%	IM, IV
Prograf	他克莫司	Fugisawa	聚乙二醇 60 氢化蓖麻油 20%	IV 滴注
Vumon	替尼泊苷	Bristol Myers Squibb	二甲乙酰胺 6% 聚氧乙烯蓖麻油 EL 50% EL50%	IV 滴注
			无水乙醇 43%	
Septa, Bactrim	磺胺甲噁唑-甲氧苄啶	Glaxo Wellcome, Roche	丙二醇 40% 乙醇 10%	IV 滴注

表 5 含有潜溶剂的眼用和耳用产品^[50]

品名 (生产商)	活性成分	潜溶剂组分
Chloroptic (Allergan)	氯霉素	PEG 300
Americaine Otic (Medeva)	苯佐卡因	PEG
Debrox Drops (Marion)	过氧化氢脲	甘油, 聚乙二醇
Auralgan Otic (Wyeth-Ayerst)	Antipyrine, 苯佐卡因, 甘油	甘油
VoSol Otic (Wallace)	乙酸	聚乙二醇

表 6 含有潜溶剂的局部用产品的实例^[50]

品名 (生产商)	活性成分	潜溶剂组分
皮肤用制剂		
Benadryl Itch-Stopping Spray (Warner-Lambert)	盐酸苯海拉明	乙醇, 甘油
Erythromycin topical (various)	红霉素	55%~77% 乙醇, 丙二醇
Lotrimin solution (Schering)	克霉唑	PEG 400
Diprolene lotion (Schering)	二丙酸倍他米松	30% 异丙醇
Lamisil (Novartis)	盐酸特比萘芬	28.7% 丙二醇
Effudex (ICN)	5-氟尿嘧啶	丙二醇
Lidex (Medicis)	乙酸氟轻松	35% 乙醇, 丙二醇
Lotrimin AF Solution (Schering-Plough)	咪康唑	PEG
Rogaine (Pharmacia-Upjohn)	米诺地尔	60% 乙醇, 丙二醇

续表

品名 (生产商)	活性成分	潜溶剂组分
口腔和咽喉制剂		
Anbesol (Whitehall-Robbins)	苯佐卡因, 苯酚	PEG, 丙二醇
Glyoxide (SKB)	过氧化氢脲	甘油, 丙二醇
Listerine (Warner-Lambert)		21.6% 乙醇

表 7 潜溶剂的溶血作用^[35]

处方组成	体内	体外方法 / (% 溶血)	
		Reed 和 Yalkowsky	Krzyzaniak 等 ¹⁾
生理盐水 (NS)	无	0.0	0.0
10% 乙醇 NS 溶液	无	0.0	0.7
30% 乙醇 NS 溶液	无	0.0	0.5
40% PG NS 溶液	有	61.0	5.6
60% PG 水溶液	有	100.0	9.5
10% PG 30% 乙醇 NS 溶液	无	0.0	1.2
10% 乙醇 20% PG 水溶液	无	8.8	2.0
10% 乙醇 40% PG 水溶液	有	69.2	10.3
20% 乙醇 30% PEG 400 水溶液	无	0.0	0.3

1) 溶血百分率大于 2 的溶剂认为在体内有溶血现象。

潜溶剂对药物化学稳定性的影响

溶剂的极性对药物化学稳定性的影响取决于反应物、产物和反应物过渡态的性质。Connors 等^[1]对反应物的不同组合进行了讨论。一般来说, 如果一种溶剂对过渡态的亲合力比另一种的强, 反应速率就会增快。根据反应物的相对电荷出现不同情况。例如, 当反应物都是离子^[40]时, 则

$$\log k_{e_2} = \log k_{e_1} - \frac{Z_1 Z_2 e^2}{2.303 k T r} \left(\frac{1}{\epsilon_2} - \frac{1}{\epsilon_1} \right) \quad (11)$$

式中: k_{e_1} 和 k_{e_2} 为电介质常数, 分别为 ϵ_1 和 ϵ_2 两种溶剂介质的反应速率常数; Z 为离子电荷; k 为玻耳兹曼常数; e 为电子电荷; T 为绝对温度; r 为两个离子之间的距离。对于离子与偶极分子间的反应有^[41]

$$\log k_{e_2} = \log k_{e_1} - \frac{Z \mu \epsilon \cos \theta}{2.303 k T r^2} \left(\frac{1}{\epsilon_2} - \frac{1}{\epsilon_1} \right) \quad (12)$$

式中: μ 为偶极矩; θ 为是生成物偶极与两粒子碰撞轴之间的夹角。对于两种偶极反应物 (假定偶极对准), 则有

$$\log k_{e_2} = \log k_{e_1} - \frac{2 \mu_1 \mu_2}{2.303 k T r^2} \left(\frac{1}{\epsilon_2} - \frac{1}{\epsilon_1} \right) \quad (13)$$

式 (11) ~ 式 (13) 说明了这样一个观念, 溶剂极性变化引起的反应速率加快或减小, 取决于反应物的电荷。例如, 如果 ϵ_1 是水的介电常数, ϵ_2 是乙醇-水混合液的介电常数, 在乙醇-水体系中两种电荷相反的离子将会降低稳定性, 而两种电荷相似的反应物将会增加稳定性。这可以通过下面的认识来理解, 即与潜溶剂-水混合液相比, 水可以

给离子和极性物质提供更大的绝缘。因此, 在水中加入潜溶剂, 增强了相反电荷物质的吸引力, 同时也增强了同种电荷物质的排斥力。

虽然, 式 (11) ~ 式 (13) 有助于理解介质对反应速率的普遍影响, 但它们定量预测反应速率的能力很可能会与在混合溶剂中预测溶解度所经历的困难类似, 存在着不准确的问题。介电常数作为单个的参数, 不能够定量溶剂与溶质分子间的所有相互作用。LePree 和 Connors^[42]报道了使用现象学方法来预测混合溶剂中的反应速率。这种方法与 Khossravi 和 Connors^[18]报道的溶解度研究类似, 用复杂的平衡来描述溶剂-溶质的相互作用。

如果在降解过程中水是一种反应物, 即反应是水解反应, 那么用潜溶剂来代替全部或部分的水就能够提高药物的稳定性。这并不意味着使用非水溶剂就能避免发生溶剂分解作用。实际上, 许多制药溶剂或溶剂混合物亲核性很强, 会参与取代反应, 然而它们的活性通常低于水^[43]。

当以使用潜溶剂来提高溶解度时, 必须注意它们对药物的稳定性的潜在影响。必须衡量潜溶剂提高溶解度的优点与对药物稳定性的潜在不良影响。

潜溶剂也可能含有能引发或催化氧化降解的杂质。PEG 类之所以是很有名的引发剂, 就是由于它们能形成不稳定的过氧化物^[44]。同样, 潜溶剂中重金属的含量会随着生产商或批次的不同而不同。在易于氧化药物的处方中使用此类潜溶剂, 需要对潜溶剂的重金属或过氧化物的含量规格做严格的限定。

Q

液体剂型处方使用潜溶剂的实例

1. 口服剂型

乙醇是口服溶液传统的潜溶剂。在酞剂中与蔗糖掺合使用,乙醇含量为3%~78%。这些处方对不同的药物有增溶和(或)稳定作用,并且同其他的溶剂相比具有更好的味道。但专门为儿科患者或其他无法忍受乙醇的患者设定的口服制剂,通常不希望使用这些处方。乙醇也会增强离子溶质的咸味^[45]。对于以上的情况,建议在口服溶液中用丙二醇替代乙醇,但鉴于以前的毒性报告,当它用于儿科处方时必须进行仔细检查^[46]。此外,由于丙二醇的口感不好需要加入矫味剂。液体PEG已用作儿科酞剂处方和软胶囊的溶剂。

2. 注射剂型

在小体积注射剂中使用潜溶剂经常是有争议的,因为一次注射的溶液体积是有限的。因此,必须在1~2mL的溶液中容纳所需的药物剂量。表6列出了含有潜溶剂的注射制品。常用的潜溶剂有乙醇、丙二醇、甘油、PEG 400和偶尔用的二甲基乙酰胺。其他的潜溶剂,如二甲基亚砜(DMSO),已用于实验抗癌剂注射处方的溶剂,但是由于毒性以及潜在的与塑料给药装置的不相容性,限制了它们的使用^[47]。

选择用于注射剂的潜溶剂时,首先要考虑刺激性和溶血性。给药的浓度和途径是确定局部反应的发生率和严重程度的重要因素。

3. 眼、耳剂型

眼处方有时候也含有潜溶剂作为部分溶剂,如丙二醇或PEG 300。眼制剂使用潜溶剂的最大局限是它们潜在的刺激性。例如,乙醇由于刺激性太强而不能用于眼睛(表3)。潜溶剂的渗透作用也很重要,甘油由于其渗透性强且增溶效果差,限制了它在眼制剂中的使用。

丙二醇、PEG、甘油以及异丙醇已用于耳制剂。表5中列出了一些含有潜溶剂的眼用和耳用制剂。

4. 局部剂型

用于透皮的液体制剂含有各类潜溶剂,通常包括乙醇、异丙醇、丙二醇、甘油以及PEG 400。选择用于透皮的潜溶剂需要考虑它们的刺激性和致敏性。此外,有必要对新化合物的光刺激性和光敏性反应进行测试。

其他潜溶剂,如二甲基亚砜,已证明对一些化合物有促进皮肤渗透的特性。尽管这是许多药物所需要的特性,但使用二甲基亚砜作为透皮的溶剂还没有得到批准。

用于口腔和咽喉制剂的潜溶剂包括甘油、乙醇、丙二醇和PEG。为这些制剂选择溶剂体系时必须同时考虑全身和局部毒性。表6列出了含有潜溶剂的用于皮肤、口腔和

咽喉的药品。

参考文献

- Connors, K. A.; Amidon, G. L.; Kennon, L. Chemical Stability of Pharmaceuticals; Wiley Interscience; New York, 1979; 39-42.
- Taft, R. W.; Kamlet, M. J. The Solvatochromic Comparison Method I. The α Scale of Solvent Hydrogen Bond Donor (HBD) Acidities. J. Am. Chem. Soc. 1976, 98 (10), 2886-2894.
- Taft, R. W.; Kamlet, M. J. The Solvatochromic Comparison Method II. The β Scale of Solvent Hydrogen Bond Acceptor (HBA) Basicities. J. Am. Chem. Soc. 1976, 98 (2), 377-383.
- Beerbower, A.; Hansen, C. Solubility Parameters. Encyclopedia of Chemical Technology; Standen, E. A., Ed.; Interscience; New York, 1971; 889-910.
- Martin, A.; Wu, R. L.; Adjei, A.; Beerbower, A.; Prausnitz, J. M. Extended Hansen Solubility Approach: Naphthalene in Individual Solvents. J. Pharm. Sci. 1981, 70 (11), 1260-1264.
- Moore, W. E. The Use of Approximate Dielectric Constant to Blend Solvent Systems. J. Am. Pharm. Assoc. Sci. 1958, 47 (10), 855-857.
- Paruta, A. N.; Sciarrone, B. J.; Lordi, N. G. Solubility of Salicylic Acid as a Function of Dielectric Constant. J. Pharm. Sci. 1964, 53 (11), 1349-1353.
- Sorby, D. L.; Bitter, R. G.; Webb, J. G. Dielectric Constant of Complex Pharmaceutical Solvent Systems I. Water-Ethanol-Glycerin and Water-Ethanol-Propylene Glycol. J. Pharm. Sci. 1963, 52 (12), 1149-1153.
- Yalkowsky, S. H.; Flynn, G. L.; Amidon, G. L. Solubility of Nonelectrolytes in Polar Solvents. J. Pharm. Sci. 1972, 61 (6), 983.
- Yalkowsky, S. H.; Rubino, J. T. Solubilization by Cosolvents I: Organic Solutes in Propylene Glycol-Water Mixtures. J. Pharm. Sci. 1985, 74 (4), 416-421.
- Yalkowsky, S. H.; Roseman, T. J. Solubilization of Drugs by Cosolvents. Techniques of Solubilization of Drugs; Yalkowsky, S. H., Ed.; Chap. 3. Marcel Dekker, Inc.; New York, 1981.
- Li, A.; Yalkowsky, S. H. Solubility of Organic Solutes in Ethanol/Water Mixtures. J. Pharm. Sci. 1994, 83 (12), 1735-1740.
- Rubino, J. T.; Yalkowsky, S. H. Cosolvency and Cosolvent Polarity. Pharm. Res. 1987, 4 (3), 220-230.
- Rubino, J. T.; Yalkowsky, S. H. Cosolvency and Deviations from Log-Linear Solubilization. Pharm. Res. 1987, 4 (3), 231-236.



15. Williams, N. A.; Amidon, G. L. Excess Free Energy Approach to the Estimation of Solubility in Mixed Solvent Systems I. Theory. *J. Pharm. Sci.* 1984, 73 (1), 9–13.
16. Williams, N. A.; Amidon, G. L. Excess Free Energy Approach to the Estimation of Solubility in Mixed Solvent Systems II: Ethanol-Water Mixtures. *J. Pharm. Sci.* 1984, 73 (1), 14–18.
17. Williams, N. A.; Amidon, G. L. Excess Free Energy Approach to the Estimation of Solubility in Mixed Solvent Systems III: Ethanol-Propylene Glycol-Water Mixtures. *J. Pharm. Sci.* 1984, 73 (1), 18–23.
18. Khossravi, D.; Connors, K. A. Solvent Effects on Chemical Processes I: Solubility of Aromatic and Heterocyclic Compounds in Binary Aqueous-Organic Solvents. *J. Pharm. Sci.* 1992, 81 (4), 371–379.
19. Chertkoff, M. J.; Martin, A. N. The Solubility of Benzoic Acid in Mixed Solvents. *J. Pharm. Sci.* 1960, 49 (5), 444–447.
20. Restaino, F. A.; Martin, A. N. Solubility of Benzoic Acid and Related Compounds in a Series of N-Alkanols. *J. Pharm. Sci.* 1964, 53 (6), 636–639.
21. Hildebrand, J. H.; Scott, R. L. Solubility of Nonelectrolytes; Chap. 3. Reinhold Publishing Co.; New York, 1950.
22. Martin, A. N.; Newberger, J.; Adjei, A. New Solubility Equation. *J. Pharm. Sci.* 1979, 60 (10), IV.
23. Martin, A. N.; Newberger, J.; Adjei, A. New Solubility Equation. *J. Pharm. Sci.* 1980, 69 (5), 487–491.
24. Amidon, G. L.; Yalkowsky, S. H.; Leung, S. Solubility of Nonelectrolytes in Polar Solvents II: Solubility of Aliphatic Alcohols in Water. *J. Pharm. Sci.* 1974, 63 (12), 1858–1866.
25. Yalkowsky, S. H.; Amidon, G. L.; Zografi, G.; Flynn, G. L. Solubility of Nonelectrolytes in Polar Solvents III: Alkyl p-Aminobenzoates in Polar and Mixed Solvents. *J. Pharm. Sci.* 1975, 64 (1), 4852.
26. Yalkowsky, S. H.; Valvani, S. C.; Amidon, G. L. Solubility of Nonelectrolytes in Polar Solvents IV. Nonpolar Drugs in Mixed Solvents. *J. Pharm. Sci.* 1976, 65 (10), 1488–1494.
27. Zografi, G.; Yalkowsky, S. H. Interfacial Properties of Polar Liquids Against Nonpolar Phases. *J. Pharm. Sci.* 1974, 63 (10), 1533–1536.
28. Van de Wiele, B.; Rubinstein, E.; Peacock, W.; Martin, N. Propylene Glycol Toxicity Caused by Prolonged Infusion of Etomidate. *J. Neurosurg. Anesthesiol* 1995, 7 (4), 259–262.
29. Yorgin, P. D.; Tehodorou, A. A.; Al-Uzri, A.; Davenport, K.; Boyer-Hassen, L. V.; Johnson, M. I. Propylene Glycol-Induced Proximal Renal Tubular Cell Injury. *Am. J. Kidney Dis.* 1997, 30 (1), 134–139.
30. Budden, R.; Kuhl, V. G.; Bahlson, J. Experiments on the Toxic, Sedative and Muscle Relaxant Potency of Various Drug Solvents in Mice. *Pharm. Ther. Part B* 1979, 5 (1–3), 467–474.
31. Cadwallader, D. W. Behavior of Erythrocytes in Various Solvent Systems I. Water-Glycerin and Water-Propylene Glycol. *J. Pharm. Sci.* 1963, 52 (12), 1175–1180.
32. Fort, E. L.; Heyman, I. A.; Kesterson, J. W. Hemolysis Study of Aqueous Polyethylene Glycol 400 Propylene Glycol and Ethanol Combinations In Vivo and In Vitro. *J. Parenter Sci. Technol.* 1984, 38 (2), 82–86.
33. Reed, K. W.; Yalkowsky, S. H. Lysis of Human Red Blood Cells in the Presence of Various Cosolvents. *J. Parenter Sci. Technol.* 1985, 39 (2), 64–68.
34. Krzyzaniak, J. F.; Raymond, D. M.; Yalkowsky, S. H. Lysis of Human Red Blood Cells 2: Effect of Contact Time on Cosolvent Induced Hemolysis. *Int. J. Pharm.* 1997, 152 (2), 193–200.
35. Krzyzaniak, J. F.; Nunez, F. A. Alvarez; Raymond, D. M.; Yalkowsky, S. H. Lysis of Human Red Blood Cells. 4. Comparison of In Vitro and In Vivo Hemolysis Data. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86 (11), 1215–1217.
36. Ward, G. H.; Nolan, P. E.; Chawla, M.; Yalkowsky, S. H. Studies in Phlebitis: Detection and Quantitation Using a Thermographic Camera. *Pharm. Res.* 1991, 8 (1), 76–79.
37. Brazeau, G. A.; Fung, H. L. Use of an in Vitro Model for the Assessment of Muscle Damage from Intramuscular Injections; In Vitro-In Vivo Correlation and Predictability with Mixed Solvent Systems. *Pharm. Res.* 1989, 6 (9), 766–771.
38. Oshida, S.; Degawa, K.; Takahoshi, Y.; Akaishi, S. Physicochemical Properties and Local Toxic Effects of Injectables. *Tohoku. J. Exp. Med.* 1979, 127 (4), 301–316.
39. Spiegel, A. J.; Noseworthy, M. M. Use of Nonaqueous Solvents in Parenteral Products. *J. Pharm. Sci.* 1963, 52 (10), 971–977.
40. Amis, E. S. Coulomb's Law and the Quantitative Interpretation of Reaction Rates. *J. Chem. Educ.* 1952, 29 (July), 337–339.
41. Amis, E. S. Coulomb's Law and the Quantitative Interpretation of Reaction Rates II. *J. Chem. Educ.* 1953, 30 (July), 351–353.
42. LePree, J. M.; Connors, K. A. Solvent Effects on Chemical Processes. 11. Solvent Effects on the Kinetics

Q

- of Decarboxylative Dechlorination of N-chloro Amino Acids in Binary Aqueous-Organic Solvents. *J. Pharm. Sci.* 1996, 85 (6), 560—566.
43. Lowry, T. H.; Richardson, K. S. *Mechanism and Theory in Organic Chemistry*, 3rd Ed.; Harper Collins Publishers: New York, 1987; 361—363.
44. McGinity, J. W.; Hill, J. A.; La Via, A. L. Influence of Peroxide Impurities in Polyethylene Glycols on Drug Stability. *J. Pharm. Sci.* 1975, 64 (2), 356—357.
45. Pernarowski, M. Solutions, Emulsions & Suspensions. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 14th Ed.; Osol, A., Hoover, J. E., Eds.; Mack Publishing Co.: 1970; 1488—1489.
46. Arulanantham, K.; Genel, M. Central Nervous System Toxicity Associated with Ingestion of Propylene Glycol. *J. Pediatr.* 1978, 93 (3), 515—516.
47. Mojavarion, R.; Repta, A. Development of an Intravenous Formulation for the Unstable Investigational Cytotoxic Nucleosides 5-Azacytosine Arabinoside (NSC 281272) and 5-Azacytidine (NSC 102816). *J. Pharm. Pharmacol.* 1984, 36 (11), 728—733.
48. Tatken, R. J.; Lewis, R. J. *Registry of Toxic Effects of Chemical Substances*. U. S. Dept. Health and Human Services ; U. S. Government Printing Office: Washington, DC, 1986.
49. Trissel, L. A. *Handbook on Injectable Drugs*, 9th Ed.; American Society of Health-System Pharmacists, Inc.: Bethesda, MD, 1996.
50. *Physicians' Desk Reference for Nonprescription Drugs*, 19th Ed.; Medical Economics Co., Inc.: Montvale, NJ, 1998.

(李 军 译)

确定失效日期

Leslie C. Hawley

Mark D. VanArendonk

Pharmacia Corporation, Kalamazoo, Michigan, U. S. A.

引言

药物失效日期与确定药物原料的再检测时间和药品的储存期或失效期相一致。药品的储存期或失效期定义为,药品在原始的封闭容器内储存,按标签上的储存条件,符合批准的储存期的时间期限。失效日期是标于容器或标签上的确切日期,指定了该批药品按照规定的条件储存能保持批准储存期的时限,并且超过这个时限后,该药品即禁止使用。为获知失效期,首先必须确定多长时间及在什么条件下,制剂能满足所有的质量标准。通常,这个问题需通过稳定性试验解决,考察时间、温度及其他环境因素对药品的物理化学性质的影响。本章不拟讨论进行试验计划的机制或赘述确定失效日期的所有试验要求,而是集中讨论在本书第一版后世界范围内有关确定失效日期的法定要求的一些改变^[1],如统计学处理稳定性数据以确定给定药品的储存期,以及审批后所做的变更对失效日期的影响,最后讨论了确定失效日期未解决的问题。

法规要求

1990年前,没有统一的、法定的、适合世界上许多国家的稳定性试验要求。在美国,那时有关确定失效日期的规范和指南的主要参考文献有《联邦法规》(CFR)^[2]、《美国药典》(USP)^[3]及1987年提交的人用药物及生物制品稳定性文件的《FDA指南》^[4]。在欧洲,为医药产品制订了药品生产质量管理规范的欧共体指南,其中包含了关于确定失效日期的少量信息^[5]。那时,更为详尽的欧洲指南为《指南备忘录》中药物及成品制剂的稳定性试验^[6]。在日本,为批准药品而确定失效日期的主要参考文献是两份指南,名为“在药品生产(进口)批准申请中所要求的处理稳定性数据的草案法规”^[7]和“实施稳定性试验方法草案指南”^[8]。目前在第Ⅲ/Ⅳ气候带国家有关确定失效期的信息很少。世界不同区域的要求有许多相似点,但也有许多不同。因为许多国家稳定性试验要求不同,适用于确定失效日期的规定也不同,确立稳定性方案的系统方案来适应全球的注册要求,并统一世界不同地区的失效期,这是不现实的。

自1990年,人用制剂的注册技术要求发端于国际协调会议(ICH)而获得了显著有效的协调,ICH在1990年第一次召开,关于新药及制剂稳定性试验的ICH三部指南的第一份草案在1992年3月23日颁布。在那份指南中,确定了美国、欧洲及日本的稳定性试验要求。通过的ICH指

导(原则)包括^[9]:

- Q1A 新药及制剂产品的稳定性试验
- Q1B 新药物及制剂产品的光稳定性试验
- Q1C 新剂型的稳定性试验
- Q5C 生物技术类生物制品的稳定性试验
- 目前在早期审查阶段的附加 ICH 指南草案如下:
- Q1D 药品稳定性试验的简化设计
- Q1E 统计分析 & 数据评价

另外,欧洲和美国管理当局已出版了区域指南,增补 ICH 指南中关于确定药品失效时限的稳定性要求。第Ⅲ/Ⅳ气候带国家的稳定性试验要求也开始统一化^[10]。下面关于确定失效时限的稳定性试验要求和规则按主要的地理区域分叙。

美国

目前美国有关确立制剂产品失效日期的稳定性试验和确定失效日期的要求收录在《美国药典》^[11]、《联邦法规》(CFR),前面提到的 ICH 指南和行业 FDA 指南草案中^[12]。CFR 涉及三个相关方面:①失效期必须出现在产品中所在的位置(§ 201.17);②什么产品需要或可免除失效期(§ 211.137);③稳定性试验要求及实验计划(§ 211.166)。因为 CFR 中人用制剂的相关部分是简约的,所以就放在本章稍后处。《美国药典》和《CFR 原则》信息相同。FDA 行业草案指南中的“药物原料和药品的稳定性试验”^[12]已取代了最初指南中的“人用药品和生物制品稳定性的提交文件指南”(出版于1987年2月)。该指南是一个提供关于稳定性数据产生和使用情况的综合性文件。它参照并包含了 ICH 的 Q1A、Q1C、Q1B 和 Q5C 的实质内容。指南提供了稳定性研究的设计、操作和使用方面的建议,对于确定失效期及支持各种法规应用是必要的。

1. § 201.17 药物:失效日期的标注位置

当药物需要标注失效日期时,如本章 § 211.137 (见下一部分)要求确定的药品失效日期,应出现在最接触药品的容器及外包装上,除非药品的外包装极易辨认。然而,当单剂量容器单件包装在纸盒中,失效期应标注在纸盒上,而不是在直接接触产品的容器上(43 FR 45076, 1978 年 9 月 29 日)。

2. § 211.137 失效日期的确定

(1) 为保证药品能满足使用时鉴别、剂量、质量及纯



度的应用标准,它应该标注按 § 211.166 中描述的适当的稳定性试验测定的失效日期。

(2) 失效期应该与标签上的那些储存条件相关,亦即 § 211.166 中描述的稳定性研究所规定的。

(3) 如果药品在配发时要复溶,标签上的失效信息应标有复溶和未复溶药品的失效信息。

(4) 失效日期应按本章 § 201.17 的要求出现在标签上。

(5) 顺势疗法药品应免除这项要求。

(6) 标有“无 US 标准效力”的能引起过敏症的提取物可免这项要求。

(7) 研究用的新药品可免此要求,只要满足适当的临床研究使用中稳定性试验表明标准或规格。若研究所用的新药在配发时复溶,标签上应有复溶药品的失效信息。

(8) 1978 年 9 月 29 日由 Federal Register 出版的免除(失效期)的待定考虑因素:如果 OTC 药品标签没有包含剂量限制并且有适当的稳定性试验数据(43 FR 45077, 1978 年 9 月 29 日;续经 46 FR 56412, 1981 年 11 月 17 日, 60 FR 4091, 1995 年 1 月 20 日修订),则证明至少在 3 年内是稳定的,可免除本节的限制。

3. § 211.166 稳定性试验

(1) 应设计书面试验计划评估药品稳定性。该稳定性试验结果用于确定适合的储存条件和失效期。书面计划如下:

- 应基于每个检测品属性统计标准确定样品量和测试间隔,以确保稳定性评估的有效性;
- 测试样品的储存条件;
- 可靠、有意义、专属的测试方法;
- 与市售药品相同包装容器的药品测试;
- 在配发时复溶的药品测试(如标签所示),及在复溶后的测试。

(2) 每种待测药品应有足够批次来确定适当的失效期数据,同时应保留这些数据记录。如果全程有效期研究结果尚不可获得但正在进行中,与组分、药品、包装容器的基本稳定性信息相结合的加速试验可用来暂定失效期。当由加速试验数据制定的暂定失效日期长于实际储存期研究得出的日期时,必须进行稳定性试验,包括在适当时距内的药品试验,直到修正暂定失效期或确定合适的失效期。

(3) 对于顺势疗法的药品,部分的要求如下:

- 应有书面稳定性评估,该评估至少基于药品的组分兼容性检测,以及药品的市场经历,以说明在正常的或预期的使用期限内药物没有降解;
- 稳定性评估应以与市售药品相同的包装容器为准。

(4) 标有“无 US 标准效力”的引起过敏症的提取物免除这项要求(43 FR 45077, 1978 年 9 月 29 日,修订在 46 FR 56412, 1981 年 11 月 17 日)。

欧盟

除了 ICH, 欧洲药品评价机构 (EMA)^[13] 下的药品

专利委员会,曾在 1997 年及 1998 年出版了许多稳定性相关的指导(原则)用于建立稳定性试验方案,并存档于许多欧洲国家。这些文件补充了 ICH 指导原则:

(1) 简化的稳定性试验计划——托架和矩阵 (Bracketing and Matrixing): 新药及其产品的稳定性试验指南注释附件^[14]——CPMP/QWP/157/96。

(2) 初次打开或接下来的复溶后,人用无菌产品最长有效期的指南注释^[16]——CPMP/QWP/159/96。

(3) 特殊商品中药品储存条件公布的指南注释^[17]——CPMP/QWP/609/96。

(4) 现有活性物质与相关最终产品的稳定性试验指南注释^[18]——CPMP/QWP/556/96。

(5) 已上市的 II 类变更稳定性试验的指南注释^[19]——CPMP/QWP/576/96。

(6) 人用药品的现行稳定性试验指南注释——现有活性物质及相关最终产品稳定性试验附件及指导注释——CPMP/QWP/2934/99。

日本

除了 ICH 指导原则,区域性指导原则中描述了日本制定失效期的特有的稳定性试验要求。日本卫生福利省 (MHW) 已刊发了“与生产或进口药物许可申请有关的稳定性试验数据的处理的指导原则”^[22]。在很大程度上, MHW 指南补充了 ICH 指南的内容。MHW 指南提供了比 ICH 和美国或欧盟使用的稳定性试验指南更为详细的“苛刻”试验要求(见上文)。实际上它提供了具体的极端试验条件、试验持续时间及次数。相反,欧盟和美国地区指导原则不具体要求这些试验条件及计划,且明确指出,“苛刻”试验通常只在常规的处方设计及建立分析方法时完成。日本的地区要求与欧美的不一致正是协调统一的重大契机。

第 III/IV 气候带国家

一般而言,第 III/IV 气候带国家不是 ICH 的成员国,尽管 Grimm^[14] 建议 ICH 三部分指南应扩展到包括第 III/IV 气候带国家在内。显然,对第 III/IV 气候带国家的稳定性试验要求与失效期制定的统一已开始迈出一大步。世界卫生组织出版了一系列指导原则,如“含有确认药物的常规制剂的稳定性试验指导原则”^[15]。该文件列出了第 III/IV 气候带国家要求的稳定性试验和条件,而且也包括销售于第 III/IV 气候带国家的药品标签上要明显标明的储存条件的建议。在这些国家,另一份与稳定性试验相关的指导原则是由 MERCOSUL (“Mercado Comunal del Sur” 或 “Common Market of the South”) 出版的文件,名为“药品稳定性”^[10]。MERCOSUL 文件特别适用于 MERCOSUL 成员国,如阿根廷、巴拉圭、乌拉圭、巴西,设计稳定性试验计划的指导原则。MERCOSUL 指南中的稳定性试验要求本质上与 WHO 文件的条件与试验要求一致。对于第 III/IV



气候带国家的稳定性试验要求, WHO 指南的要求被公认是肯定的, 正在工业界贯彻以支持药品在这些国家上市。

由长期稳定性数据统计分析确定储存期

目前采用统计学分析长期稳定性数据来预测有效期。通常将加速稳定性数据作为辅助数据。尤其是, ICH 的 Q1A, CPMP QWP/556/96 及 FDA 指南草案均建议, 药品的有效期由平均降解曲线上 95% 单侧置信限与可接受的标准低限的相交点确定。通常测定有效期的统计学分析需要三批规模化生产的药品及至少 12 个月的长期稳定性数据。单批数据首先用最小二乘法拟合处理。代表降解行为的真实直线不能预先检测到, 但可用最小二乘法分析估计, 也同时获得了稳定性数据与拟合的最小二乘法直线的置信区间。如上文所述, 由代表置信限的直线与注册的上下限间的截距表示失效日期。如果用适当的统计学方法处理, 若批(降解)回归方程的斜率及零时截距表明批与批之间的变异很小(如拒绝域显著性水平的 p 值超过 0.25), 那么最好混合所有的数据作为一个整体来对储存期进行全面估计。如果不适宜混合几批的数据, 可用保持可接受和合理限度的一批的最小时限值确定整体的有效期^[9,12]。关于使用回归分析处理长期稳定性数据的统计学评估的详细信息、批与批之间相似性测验及数据的混合归纳请参看 Carstensen 等^[16]、Wessels 等^[17]、Lin 等^[18]、Bancroft^[19]的文章及《FDA 指南》^[12]。

按照 ICH 或 FDA 指南, 处理稳定性数据的统计学分析软件包均有市售。而且, FDA 已开发并公开了它自己的药物处方稳定性试验程序, 即 STAB, 它能从 FDA 网站下载^[20]。这种用长期试验数据来计算有效期的统计学方法应用于新药及其产品^[9,12], 包含已确证不稳定主药的产品^[15]。

用上述的统计学分析确定有效期时, 常常会将回归线外推到没有稳定性数据的那些时间。既然超出观测范围的外推法是有效的, 假定的降解关系仍可继续用作估算的有效期。如稳定性试验的 FDA 草案指南所述^[13], 以此种方式指定的有效期应总能被加速试验数据佐证, 这些失效期均被认为是暂时的, 直到可以用至少三个生产批样品的全部长期稳定性数据的年度报告最终确定。对于已知的稳定产品, 可以采用更灵活的方法。根据 WHO 指导思想^[15], 如果一个产品的主药是稳定的, 这些稳定性研究已按表中的加速试验条件执行, 用于第 III/IV 气候带国家没有显著变化, 可以直接先指定有效期为 24 个月; 佐证的数据显示类似的处方已被指定 24 个月或更长的有效期; 厂家继续做实际情况的有效期研究直到超过建议的有效期为止。对于 ANDA 覆盖的产品(简单的剂型), 如果 0、1、2 及 3 个月的加速稳定性数据及其长期稳定性数据证明是满意的, FDA 也允许直接指定标示的储存条件, 有效期可长达 24 个月^[12]。然而 CPMP 指导原则 QWP/556/96 并不认同此种方法, 建议用现实条件下数据的统计学分析来确定有效期, 甚至对于已有的药物及其产品^[13]。

如何通过前文的统计学分析确定实际的失效日期也是很重要的。FDA 草案指南及 CPMP/QWP/486/95 均提到: 药品有效期的计算其开始日不应该迟于该批药品上市的时间^[12,13]。通常上市的日期不应超过生产日期 30 天, 而不管包装的日期^[12]。如果该批的上市日期不在 30 天内, 应采用另一个标准确定有效期。在此情况下, 失效期的计算应以药品生产的 30 天内开始, 而不是从上市期开始^[12,13,21]。如果失效期仅包含一个月和一年, 产品应在那个月的最后一天满足标准^[21]。按标签建议的储存条件进行的长期稳定性试验获得的数据应支持指定的有效期^[12]。

多温度数据采用下述的 Arrhenius 分析, 不能单独确定不同温度下的有效期, 只能用长期数据来确定。这主要是因为不同的温度下降解机制不同, 使 Arrhenius 方程不能用加速试验数据来预测最终的有效期。尽管 Arrhenius 方程分析不是根据加速试验数据来推测暂定有效期的主要方法, 但它应用于加速试验数据结合长期试验数据的外推, 能作为支持性数据。如下描述, 用 Arrhenius 分析可以预测储存条件或气候带对有效期的影响。

储存条件或气候带对有效期的影响

用 Arrhenius 方程分析给定的降解过程得出温度与速率常数的关系。此分析结果对预测储存条件或气候区带的改变对药品给定的有效期的影响很有用。尤其是 Arrhenius 方程能用作预测有效期与标签储存条件间的关系。事实上, 特定的处方及容器/封闭系统可能有不同的有效期, 取决于它们在哪个气候区带国家上市。温度与速率常数之间的关系推导如下:

零级过程, 许多化学反应都是该模式, 反应物 A 消耗的速率是常数, 与浓度无关, 如式 (1) 所示:

$$-dA/dt = k \quad (1)$$

由式 (1) 导出式 (2):

$$A = A_0 - kt \quad (2)$$

式中: A 为时间 t 反应物 A 剩余的量; A_0 为反应物 A 的初始量; k 为速率常数。对于遵循零级动力学过程反应, A 对 t 的作图得到一条直线, 其斜率为 $-k$ 。

对于一级过程, 反应物 A 的消耗速率在任一时间 t 与 A 的浓度成正比, 如式 (3) 所示:

$$-dA/dt = kA \quad (3)$$

由式 (3) 导出式 (4):

$$\ln(A/A_0) = -kt \quad (4)$$

或

$$\ln A = -kt + \ln A_0$$

遵循一级动力学的稳定性数据, $\ln A$ 对 t 作图将成一直线, 其斜率为 $-k$ 。在几乎所有情况下, 速率常数 k 是温度 T 的函数。对大多数制剂产品, 随着 T 的升高, 速率常数增大, 因而降解速率增大。这是熟知的 Arrhenius 关系的基础, 即对特定的化学反应, k 与 T 的经验关系如式 (5) 所示:

$$k = b_0 e^{-E/RT} \quad (5)$$

或

$$\ln k = \ln b_0 - E/RT$$

式中： T 为热力学温度； E 为活化能； R 为摩尔气体常量； b_0 为依赖于该分子的常数。

如果特定的动力学过程遵循 Arrhenius 定律， $\ln k$ 对 $1/T$ 的作图将成一直线，其斜率为 E/R 。

Arrhenius 分析应用的一个好例子是制剂产品的储存期受到活性成分 A 的降解限制。使用指示稳定性的含量分析，A 在 25℃ 随时间的减少量显示在标示量的 90%~100% 之间并遵循 0 级动力学方程。另外，在 40℃、50℃ 及 60℃ 时的加速试验数据也表现出相同的零级动力学行为。如果 25℃、40℃、50℃ 及 60℃ 加速试验的速率常数遵循式 (5)，根据此种基质中组分 A 的 $\ln k$ 对 $1/T$ 的直线图，在数据范围内任一温度的速率常数都可以通过插值法获得。因此知道任一温度的 k 及在那个温度所经历的时间，可以用式 (2) 计算其稳定性情况。换句话说，在 Arrhenius 分析有效的储存或气候带条件下，可以用 Arrhenius 方程来预测任一温度时的失效日期。尽管该方程对于理解温度的变化对有效期的影响是有用的，但一种温度下的降解机制不同于另一种温度下的降解机制时，Arrhenius 关系将失效。

Grimm 已用 Arrhenius 关系测出“预测因子”，可用于加速试验数据以预测不同气候区带国家长期试验的储存期^[4]。例如，40℃ 时的降解速率可以这样来测定：将药物在 25℃ 或 30℃ 降解 5% 所经历的时间乘以这个温度下的“预测因子”。当活化能为 85 kJ/mol 时，Grimm 推导出 25℃ 或 30℃ 时的“预测因子”分别为 5 和 3.3。显然“预测因子”的使用仅是一个近似值；另外，使用时应注意，温度不同，由 Arrhenius 分析得到的结果不同。

审批后的变更对有效期的影响

制剂产品及其相关的有效期和储存条件获批准以后，

常常需要改变产品的某些因素（如生产过程、处方、包装等）。当审批后发生变更时，批准的原产品有效期必须重新证明其合理性。为证明审批后发生变更的失效期的合理性，要求做许多新的或不同的稳定性试验。自本文上一版以来，对有关审批后变更要求的稳定性试验的新规则和对现有规则的修改已有重大发展。

ICH 的 Q1C：“稳定性试验：新剂型的要求”是 ICH 指南（1997 年 5 月出版）Q1A 的附件，提出在药物及药品最初申报之后，原申请人应提交新剂型稳定性相关的数据。在美国，FDA 发布了规模化和审批后变更（SUPAC）指导方针，指出了在美国申请新药的各种审批后变更的稳定性试验要求。现行 SUPAC 指南列在下面^[23]：

(1) SUPAC-IR——速释固体口服剂型规模化和审批后变更：化学、生产及质控，体外溶出试验和体内生物等效性文件（生产设备附录，发行于 1999 年 1 月）。

(2) SUPAC-MR——修饰释放固体口服剂型规模化及审批后变更：化学、生产及质控，体外溶出试验及体内生物等效性文件（1997 年 10 月 6 日发行，生产设备附录，发行于 1999 年 1 月）。

(3) SUPAC-SS——非灭菌半固体剂型规模化及审批后变更：化学、生产及质控，体外释放试验及体内生物等效性文件（1997 年 5 月发行，1997 年 6 月 16 日公布，附录发行于 1998 年 12 月）。

在欧洲，引入两份法规论述医药产品的变更，规则（EEC）No. 541/1995 及 542/1995。为了实施这些规则提出的流程，制定了许多指南，并颁布了上市产品的变更申请表。

在美国，特定变更所要求的稳定性试验测定方法遵循一种等级方式，审批后越显著的变更（SUPAC 文献）要求越多附加的稳定性数据。从关于稳定性试验的 FDA 指南中复制出的表 1，描述了支持审批后的变更要求的 5 种稳定性数据包类型。

表 1 支持审批后变更的稳定性数据包类型

稳定性数据包	提交时的稳定性数据	稳定性要求
类型 0	无	常规要求
类型 1	无	第一批及之后每年批次的长期稳定性研究
类型 2	具有相应变化的一批 ¹⁾ ，药品的三个月比较加速试验数据及其长期试验数据	第一批 ²⁾ 及之后的每年批次的长期稳定性研究 ³⁾
类型 3	具有相应变化的一批 ¹⁾ ，药品的三个月比较加速试验数据及其长期试验数据	前三批 ²⁾ 及之后的每年批次的长期稳定性研究 ³⁾
类型 4	具有相应变化的三批 ¹⁾ ，药品的三个月比较加速试验数据及其长期试验数据	前三批 ²⁾ 及之后的每年批次的长期稳定性研究 ³⁾

1) 可接受的中试规模。

2) 如果没有，在增补材料中提交。

3) 在年度报告中应用批准的稳定性方案和报告数据。

对审批后变更的每一类型，用表 1 来帮助决定应提交的稳定性数据包的类型。至于不同变更必需的稳定性数据包类型的讨论可以在关于稳定性试验的 FDA 草案指南中找

到^[2]，而且如上所列，特定剂型信息在 SUPAC 指南中能找到。对某些变更，可以不需要提前批准，而提交影响有效期的变更的补充材料。在欧洲则不是如此，按审批后变

更生产的药品在销售之前所有审批后的变更均需要增补材料送请批准。

有效期的延长或缩短

在广泛收集稳定性数据后,经常要求改变产品的有效期。特别是有效的稳定性数据可以支持对以前的申报资料中通过的失效期进行延长或缩短。FDA 指南涵盖了失效期的更改。

例如, FDA 指南列出了可获得延长有效期的方法^[12]:

(1) 如果能满足批准方案所提的标准,可以记录在年度报告中。在此情况下,有效期的延长必须以至少三批生产样品(21 CFR 314.70)的全部长期稳定性数据为基础。

(2) 以三批中试规模的样品为基础来延长暂定失效期,提前批准的补充资料是必需的。此有效期保持临时性直到至少完成三批生产样品的全部长期数据。

缩短有效期的方法是提交变更影响(有效期)的补充材料(21 CFR 314.70 或 21 CFR 601.12)。

新干禧之年未解决的问题

两个主要的问题仍需要关注:第一,实现全世界稳定性试验要求的统一。特别是协调不同 ICH 成员国的“极端”试验要求大有益处,完成所有第Ⅲ/Ⅳ气候区带国家稳定性试验要求的统一,更广泛地着重在第Ⅲ/Ⅳ气候区带国家(30℃、70%RH 作为长期稳定性试验的储存条件)与 ICH 成员国(30℃、60%RH 作为中期储存条件)之间稳定性试验条件的统一。第二,标签上储存说明的世界范围统一。因为稳定性研究的最终目的是预测在特定的标签储存条件下产品的有效期,标签储存条件对于稳定性试验要求的统一有重要意义。不幸的是,事实不是如此。Q1A 建议标签应以每个国家的要求为基础,这些要求对大多数国家来说是不同的。例如,在美国,标签说明要满足 USP 要求。而在欧洲不需要标签。在日本,仅当产品的有效期小于 3 年时标签才是必需的。在 WHO 指南中,标签也按各国的要求来定。可见,标签储存说明的统一有待完成。稳定性试验要求在世界范围内更彻底的统一,以及标签储存说明的统一,有望实现稳定性试验计划的合理化以支持全球化市场。

结论

稳定性试验要求世界范围内的统一已取得显著进步,但还不完全(如标签上的要求是各个国家特定的)。在最近十年,ICH 指南及区域指南附件已明显促进了在欧洲、日本及美国稳定性试验要求的统一水平。WHO 对制剂产品的稳定性试验指南包括已确立的传统剂型中主药(稳定性)方法。MERCOSUR 指南已开始去完成第Ⅲ/Ⅳ气候区带国家稳定性试验要求的统一工作。仍有相当多的统一工作需

要在第Ⅲ/Ⅳ气候区带国家完成。由于第Ⅲ/Ⅳ气候区带国继续统一要求,令人感兴趣的是,ICH 是否会采纳一个新的折中条件代替 30℃/60%RH,这将使世界上四个气候区带确定有效期的试验要求得到统一成为可能。

参考文献

1. VanArendonk, M.; Dukes, G.R. Expiration Dating. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Swarbrick, J., Boylan, J.C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1995; 5, 379-394.
2. Federal Register 601. January 15, 1971.
3. U.S. Pharmacopeia XXII. National Formulary XVII; U.S. Pharm. Convention, Inc.: Rockville, MD, 1990; 10.
4. Guideline for Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drugs and Biologics, Washington, DC, 1987.
5. Guide to Good Manufacturing Practices for Medicinal Products. The Rules Governing Medicinal Products in the European Community, Vol. IV. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; Luxembourg, 1989.
6. Stability Tests on Active Substances and Finished Products, Notes for Guidance Concerning the Application of Section F of Part I of the Annex to Directive 75/318/EEC. III/66/87-EN, Rev. 4, Brussels, 1988, 7.
7. Notification No. 698, Pharmaceutical Affairs Bureau, Japanese Ministry of Health and Welfare, Tokyo, 1980.
8. Draft Policy to Handle Stability Data Required in Applying for Approval to Manufacture (Import) Drugs and Draft Guidelines on Methods to Perform Stability Test, Ministry of Health and Welfare; The First Evaluation and Registration Division, Pharmaceutical Affairs Bureau, 1990.
9. <http://www.ifpma.org/ich5q.html#stability> (accessed April 2000).
10. MERCOSUL/GMC/P. RES No. 53/96.
11. U.S. Pharmacopeia XXIV. National Formulary XIX; U.S. Pharm. Convention, Inc.: Rockville, MD, 2000.
12. <http://www.fda.gov/cder/guidance/1707dft.pdf> (accessed April 2000).
13. <http://www.eudra.org/emea.html> (accessed April 2000).
14. Grimm, W. Extensions of the International Conference on Harmonization Tripartite Guideline for Stability Testing of New Drug Substances and Products to Countries of Climatic Zones III and IV. Drug Dev. Ind. Pharm.



Q

- 1998, 24, 313—325.
15. WHO Technical Report Series 863, World Health Organization Geneva, Switzerland, 1996
16. Carstensen, J. T.; Nelson, E. W. J. Pharm. Sci. 1976, 65, 311.
17. Wessels, P., et al. Statistical Evaluation of Stability Data for Pharmaceutical Products for Specification Setting. Drug Dev. Ind. Pharm. 1997, 23, 427—439.
18. Lin, K. K.; Lin, T-Y.D.; Kelley, R. E. Stability of Drugs: Room Temperature Tests. Statistics in the Pharmaceutical Industry; Buncher, C. R., Tsay, J.-Y., Eds.; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1994; 419—444.
19. Bancroft, T. A. Analysis and Inference for Incompletely Specified Models Involving the Use of Preliminary Test (s) of Significance. Biometrics 1964, 20 (3), 427—442.
20. [http: //www. fda. gov](http://www.fda.gov) (accessed April 2000).
21. Washington Drug Letter, No. 36. 1999, 31.
22. Handling of Data on Stability Testing Attached to Applications for Approval to Manufacture of Import Drugs, Notification No. 413; Pharmaceutical Affairs Bureau, Japanese Ministry of Health and Welfare, Tokyo, 1992.
23. [http: //www. fda. gov/guidance/1721fnl. pdf](http://www.fda.gov/guidance/1721fnl.pdf) (accessed April 2000).

(陈满仓 译)

热分析在药物及药物制剂中的应用

Daniëlle Giron

Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland

引言

热分析是在程序升温或降温下,测量物质的物理性质与温度或时间的关系的一类技术,是分析药物及药物制剂性质的一种重要手段,通过模拟药物的加工和老化条件,可以获得其热力学参数。同时为得到物质的其他信息,热分析往往与其他分析技术联用,或作为互补,如光谱、色谱、熔点、干燥失重、成分分析、定性分析、纯度检测和定量分析。在聚合物、纯物质和混合物的物理和化学性质分析中,它们是基本方法。热分析已广泛用于药品的试制、加工生产及产品质量控制过程中。自动控制的采用大大增加了热分析技术的优越性。联用技术与微热分析开拓了测量技术新领域。

原理与实验要素

由于物质待测物理参数的多样性,所以应运而生的测试技术也非常多,一些主要测试技术 Wendlandt^[1]已作了详细描述。在药物分析方面,主要采用如下技术:差示扫描量热法(DSC),热重法(TG或TGA),热机械分析(TMA)。所有技术均自动控制并采集数据。联用技术及调制式DSC是新近发展起来的测试技术,被誉为21世纪“技术的典范”。文献[1~15]列举了一些关于热分析测试技术的原理、装置以及应用的有关于医药行业的优秀书籍和期刊论文,Cheng等在文献[14]中重点提出了在今后二十年的热分析发展趋势,在研究材料结构、动力学与温度的依赖关系中,热分析将提供更为精确和更有意义的数

1. 差示扫描量热法(DSC)

当一种材料在加热或者冷却时,其结构或成分将发生变化,这些变化同时伴有热量的变化。差示扫描量热法(DSC)是在程序温度控制下,测量样品的热现象,以及释放或吸收的热流。1887年,Le Chatelier建立了首台差热分析仪(DTA),该仪器仅用于测量物质的温度变化。

DSC的工作原理:两个炉体平行加热,一个炉体中放样品盘,另一个炉体中放一空盘作为参比盘。在加热过程中,如果样品没有发生任何改变,则样品盘与参比盘温度一致。如果样品有变化,如发生熔融,样品将吸收热量,样品盘温度不变,而参比盘温度升高,导致样品盘与参比盘之间存在温差。

制造商采用两种测量方式。一种为“热流型DSC”,测量出试样和参比的温差(DTA),经过计算,转换成热流,

dq/dt ,热系数与温度有关。另一种为“功率补偿型DSC”,试样盘和参比盘分别具有独立的加热器和传感器。由两个控制系统进行监控,其中一个控制温度,使试样和参比物在预定的速率下升温或降温;另一个用于补偿试样和参比物之间所产生的温差。这个温差是由试样的放热或吸热效应产生的。如果检测出任何温差,则分别加热校正使两个盘中温度保持一致。即发生吸热或者放热反应时,系统补偿功率使两个盘中温度保持一致。

总之,热流型DSC主要测量的是温差,功率补偿型DSC是测量能量。在常规应用时,仪器的测量原理是否相同并不重要,因为在校准和综合数据处理方面,所有仪器的质量相近。

不同仪器能够提供相同的信息,即热流与温度(时间)之间的关系。仪器的测量原理和性能决定峰形、分辨率和灵敏度。

一级转变,如,熔融、晶相转变、升华及挥发等,曲线体现出转变过程中能量的变化。二级转变则反映出热容的变化,如玻璃化转变。

图1显示了典型的转变过程。熔融和晶相转变为一级转变, T_g 为熔融或沸点外推温度,峰顶温度(T_m)依赖于仪器和测量参数。玻璃转变温度取决于曲线拐点。不同仪器热流有不同的表示:功率补偿型DSC中吸热为正,而热流型DSC中吸热为负。熔融、升华和挥发为吸热,即需要吸收热量。结晶为放热,即释放能量。没有熔融的脱溶剂化通常是吸热的,固-固相转变和分解可为吸热或者放热。

现代仪器能够在低温(制冷系统控制)至高温(1200~1500℃)的区域内升温、降温 and 等温,为了避免与空气反应,故在氮气条件下进行。仪器的主要部件有:DSC传感器、炉体、测试软件及数据处理系统。横坐标为程序温度,并非样品温度。

程序温度与试样实际温度存在热滞后现象,它与仪器的热阻和升温速率有关。现代仪器能够更精确地分析测量药品,传感器直接与托盘底部连接,试样量为毫克级甚至更少,因此校正值并不很大,但也必须予以考虑,通常用99.9999%金属钢来校正热滞。

近年来,通过比较仪器的测试原理和测量结果以及一些关键参数,如升(降)温速率、粒径、试样量、气氛、试样皿类型(敞口、密闭)等,以此来验证不同的仪器性能,在这方面取得了较大的成就。

每年应对仪器进行校正,包括温度和热焓校正。大多数标准物采用高纯金属,金属钢可作为首选标准物,但仅校正一个温度是不够的,因药品通常包含数个具有精确熔

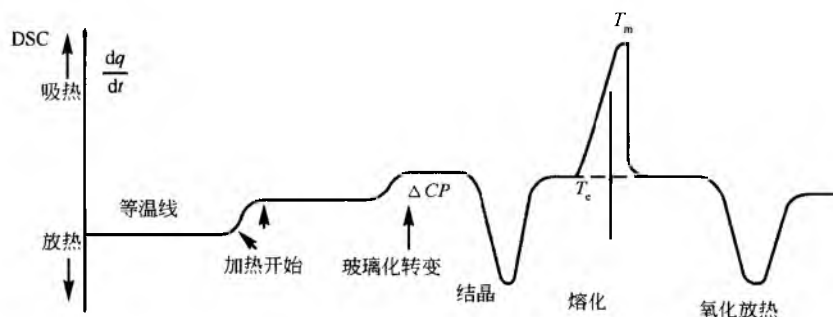


图1 DSC扫描的原理

点和熔融焓的有机物质, Sarge 等在文献^[16~17]中提出了几种有机和金属标准物。石英的热性质也有报道, Sabbah 最近发表大量的有机物质的有关资料^[18], 对药品来说, 已被确认、鉴别的物质覆盖了广泛的区域, 涉及面足以包含所感兴趣的热分析过程。

表1、表2列出了不同物质在 Perkin-Elmer DSC-7 型热分析仪上所测得的温度和热焓^[20]。对于医药行业来说, 提供参照的实验室的可信性是非常重要的。由于升温速率可能影响数据, 建议在不同温度区域, 采用不同的升温速率, 比较添加钢后的标准有机物的熔点和热焓。为得到更为准确的测试结果, 建议在不同的温度区域进行多次标准样熔点校正。

表1 N₂ 氛围、10 K/min 升温速率、Perkin-Elmer DSC-7 型热分析仪的校正数据

标准物	$T_{\text{起始}}/^{\circ}\text{C}$ (检定书)	仪器 1 $T_{\text{起始}}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta T/^{\circ}\text{C}$	带有内置冷却器的仪器 2 $T_{\text{起始}}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta T/^{\circ}\text{C}$
碘苯	-31.3			-32.2	0.9
水	0.0			0.1	0.1
4-硝基甲苯	51.5	50.4	1.1	51.2	0.3
联苯	69.3	68.2	1.1	68.6	0.7
萘	80.2	79.4	0.8	80.1	0.1
二苯甲酰	94.7	94.21	0.6	94.5	0.2
乙酰苯胺	114.0	113.9	0.1	113.6	0.4
苯甲酸	122.1	122.0	0.1	121.8	0.4
二苯乙酸	146.5	146.9	0.4	146.9	0.4
铜	156.6	156.8	0.2	156.5	0.1
对甲氧基苯甲酸	183.1	183.6	0.5	183.2	0.1
2-氯-蒽醌	210.0	210.1	0.1	210.1	0.1
锡	231.9	232.7	0.8	232.7	0.8
蒽醌	284.5	285.2	0.7	284.8	0.7
铅	327.5	328.6	1.1	—	—
锌	418.9	420.3	1.4	—	—

表2 N₂ 氛围、10 K/min 升温速率, 两台 Perkin-Elmer DSC-7 型热分析仪在不同时间 (A, B, C,) 的校正数据

标准物	$\Delta H/(\text{J/g})$ (理论)	A		B		C	
		$\Delta H/(\text{J/g})$	偏离/%	$\Delta H/(\text{J/g})$	偏离/%	$\Delta H/(\text{J/g})$	偏离/%
萘 (80.2 $^{\circ}\text{C}$)	148.6	147.1	1.0	148.6	0.0	—	—
二苯甲酰 (94.7 $^{\circ}\text{C}$)	112.0	110.1	1.7	112.8	0.7	—	—
苯甲酸 (80.2 $^{\circ}\text{C}$)	147.2	—	—	—	—	146.6	0.4
联苯 (69.3 $^{\circ}\text{C}$)	120.4	120.0	0.6	—	—	120.5	0.1
二苯乙酸 (146.5 $^{\circ}\text{C}$)	146.9	—	—	146.8	0.1	—	—
铜 (156.6 $^{\circ}\text{C}$)	28.7	28.63	0.2	28.8	0.35	28.7	0.1
锡 (231.9 $^{\circ}\text{C}$)	60.2	60.0	0.3	—	—	60.8	1.0



1.1 压力 DSC

通过压力 DSC (PDSC), 可以获得物质在不同生产过程的压力下的特性, 或者区分诸如脱溶剂化所显示的重叠峰^[21]。

1.2 调制 DSC

1993 年提出的调制 DSC 技术^[22]已被彻底研究和讨论。其主要优点在于分离 DSC 曲线中的重叠过程。常规 DSC 采用恒定的升温或降温速率。在调制 DSC (MDSC) 中, 对传统的线性等速升温叠加正弦调制 (振荡) 信号, 形成正弦形升温方式。利用傅立叶数学变换, 将 DSC 信号分为不可逆过程 (动力学) 和可逆过程两部分。

$$T = T_0 + bt + B \sin(\omega t)$$

$$dq/dt = C(b + B\omega \cos(\omega t)) + f'(t, T) + K \sin(\omega t)$$

式中: T 为温度; C 为热容; t 为时间; ω 为频率; $f'(t, T)$ 为无温度调制的动力学响应; K 为对温度调制动力学响应的幅度; $(b + B\omega \cos(\omega t))$ 为测得的升温速率 dT/dt 。

完整的 DSC 曲线, “同相”代表可逆转变 (例如玻璃化转变), 而“相移”代表不可逆转变。MDSC 是常规 DSC 的扩展, 适用于精确测量玻璃化转变温度, 以及研究弛豫能^[24]。近期已用于测量羟丙甲基纤维素膜的玻璃化转变温度^[25], 无定形乳糖的研究^[26], 以及若干玻璃状药品的研究^[27]。

1.3 微波热分析 (MWT A)

在这项新的技术领域^[28], 微波既用于加热物质又用于检测热传递。

1.4 微型 DSC

传统的 DSC 仪器测量所需的试样量非常少, 作者使用 Perkin-Elmer DSC-7 型热分析仪测定钢的熔化峰需要样品量仅 0.032mg。微型 DSC 不仅可以减少试样量至纳克级, 而且可以增加仪器灵敏度^[29]。

2. 微量热仪

微量热法是在 DSC 的基础上发展起来的一门技术^[30~31], 在药物分析方面可以弥补 DSC 的不足。较大的样品量和高灵敏度的特点, 可用于研究 DSC 无法检测的极低焓变现象。微量热仪的物理表征量为热值变化率与时间的关系, 测量精度可达 $0.1 \mu W$ 。微量热法可应用于特殊气氛下的隔离系统或者反应物的混合体系。在恒温或绝热状态下, 微量热计可用于溶液热量测定 (见本书中热量测定的相应文章)。

3. 热重分析

热重分析 (TG 或 TGA) 测量样品质量随时间或温度的变化。仪器为一热天平, 可持续考察样品质量随时间的变化情况。样品杆和参比杆分别位于热天平的两侧。样品杆位于炉体内, 但不直接接触样品, 温度通过程序来控制。

天平部分处于一个温度恒定的环境中, 热重分析仪能够测量样品失重或增重随时间或温度的变化情况, 即 $[m = f(T)]$ 。大多数仪器同时也记录 DTG 曲线, 即质量变化率随温度的变化, $dm/dt = f(T)$ 。

DTG 曲线, 可以更好地区分重叠峰, 如图 2 中的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 。DTG 曲线下面积代表样品质量的改变, 在任一温度下的 DTG 的峰高代表样品质量的变化速率。DTG 真正的优势在于如果样品脱溶剂化后紧接着样品分解, 那么通过 DTG 曲线可以精确确定脱溶剂过程的终点。

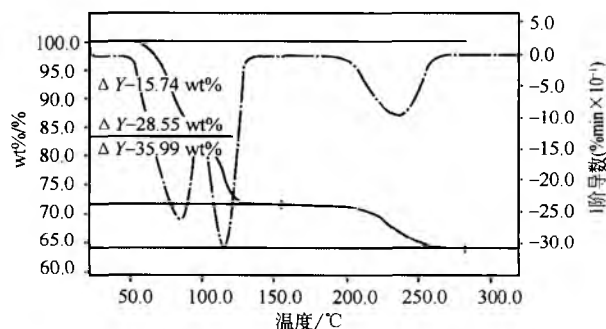


图 2 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 在 20K/min 下的热失重曲线; 利用 DTG 分离不同的脱水阶段

热重分析仪简而言之就是带有数据处理功能的热天平 (平衡控制器, 样品室, 炉体, 炉体温度控制器)。为了检测系统的稳定性, 在仪器的最大温度范围内, 以不同的升温速率测量仪器最高灵敏度时的基线, 升温速率越大, 热天平偏离越大。热天平有垂直和水平两种结构。新型热天平灵敏度可达到 $0.1 \mu g$ 。一些厂商还研制出了 DSC/TG 联用仪器。

对于现在的 TG 来说, 质量测量精度并不是问题, 用标准砝码校准一如其他天平的标定。通过常规校准, 静电、温度波动、灵敏度及热滞后等均达到最佳控制状态。对于自动 TG 而言, 样品盘必须密闭直至测量前才开孔, 因其脱溶剂化与敞口样品盘情况可能不同。除了样品量和升温速率外, 气氛及其流量也将影响热分析的温度测量。图 3 为不同升温速率对 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 的影响。通过对所需温度范围内基线的最大偏差的计算, 可确定仪器的检测限。

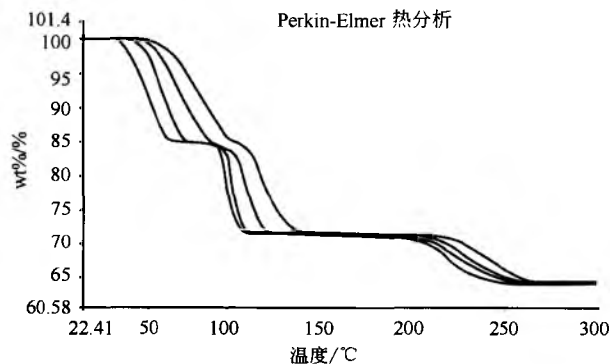


图 3 升温速率对 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 热失重曲线的影响。从最上面开始升温速率分别为: 20K/min、10K/min、5K/min、2.5K/min

表3中列举了在不同的升温速率下水合物计算的例子,脱水起始温度为50~120℃,结束温度在150~270℃之间。

表3 三种水合物在不同升温速率下的失重校正数据

物质	理论失水量	结果		
		5K/min	10K/min	20K/min
二水合酒石酸钠	15.7%	15.73%	15.60%	15.73%
一水草酸钙	12.3%	12.55%	12.51%	12.48%
五水合硫酸铜	36.1%	36.08%	36.03%	36.04%

在热重分析仪中,由于样品托盘不与炉体接触,因此热滞后现象要比DSC严重。ICTA(国际热分析协会)和NBS([美]国家标准局)列出了一些磁性标准物质在磁场中失磁时对应的温度(居里点):镍(354℃),合金Permanorm 3(266℃),镍铁合金(386℃),合金Permanorm 5(459℃),合金Trafoperm(754℃)。高精度温度校准不主张采用该方法,多位专家研究证实^[32],上述校准方法的温度偏差在5~10℃。McGhie等^[33]提议用可溶性金属丝悬挂惰性金属铂砝码的途径来进行校准,当温度达到金属丝的熔点时,金属丝熔断,TG线上将随即出现金属铂砝码的失重。Mettler TGA 850型仪器的构造设计更易于测量和计算标准熔融曲线,如表4所示。

表4 TGA 850 熔融法的温度校正数据

物质	理论	结果		
		5K/min	10K/min	20K/min
硝基甲苯	51.5℃	51.49℃	51.64℃	53.78℃
铜	156.6℃	157.62℃	157.38℃	157.74℃
锡	231.9℃	233.44℃	233.42℃	233.68℃

TG可用于不同气氛及真空中。它在药物方面有广泛的应用。自动TG可非常有效地替代药物烘干失重的测定,只需极少量的试样便可从样品的分解中分离出溶剂的失重,因夹带或键合溶剂等作用而形成的溶剂化物同样也比较容易测定^[9,34,35]。Dunn和Sharp最近发表了一篇全面的关于TG的文章^[36],Ozawa建议采用改进的TG进行动力学分析^[38]。

利用热天平能够实现水的吸附与解吸附等温线的测定。现在一些特殊仪器能够在不同温度下测量水的吸附与脱附的等温线(例如,动态蒸发吸附仪(DVS),表面测量系统有限公司,Monacrch Beach,US)。

4. 热机械分析

热机械分析(TMA)是在程序控制温度下,测量物质在应力下的形变与温度(或时间)的关系,温度随着时间等速升降,通过机械、光学或电子传感器测量物质的形变,所施加的应力可以是压缩、刺入、拉伸、弯曲以及扭转等。此外,TMA还可用于试样尺寸测量,此装置称为热膨胀仪。应力(F/A)可表示为 N/m^2 或Pa,也可以表示为常

规的拉伸应力 σ ,或剪切强度 τ ,或压力改变量 Δp , F 和 A 分别表示压力和面积。

通过应变可测量变形,表示单位长度上的形变。

伸长: $\epsilon = \Delta L/L_0$

体积应度: $\epsilon = \Delta V/V_0$

剪切应度: $\gamma = \Delta x/y$

对于弹性材料,杨氏弹性模量可表示为:

$$E = (F/A)/(\Delta L/L_0) \text{ 或 } E = \sigma/\epsilon$$

以上参数都与温度有关,热膨胀系数为 $\alpha = \left[\frac{dL}{dT} \right] \left[\frac{1}{L_0} \right]$ 。

TMA除了炉体外,主要部件为一个线性变量微分转换器(LVDT),根据线性移动产生一个电信号。另一单元控制施加的外力特殊附件可使仪器在拉伸、压缩、刺入等模式下工作。

通过DTMA可得到TAM的斜率: $\frac{dL}{dt} = L_0 \alpha \frac{dT}{dt}$

其中 dT/dt 为升温速率。

热机械分析对于分析材料的多晶形转变和玻璃化转变是非常有效的,图4为刺入式和拉伸式的玻璃化转变和形变的理论曲线。最近有人建议用TMA来测定不同相对分子质量的乙基纤维素药片的内应力^[37],以及聚糖凝胶^[39]和聚合膜的膨胀^[40]。

TMA仪器的长度校准可用标准长度的条形金属或陶瓷来进行。而温度校准一如DSA,可用钢、锡、铅等标准物,最近已经出版了关于TMA校准和误差的刊物^[41]。

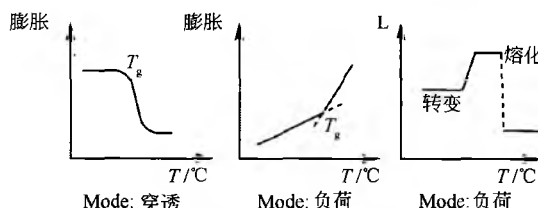


图4 玻璃化转变温度 T_g 和多晶型转变的理论TMA曲线

5. 动态热机械法

动态热机械法(DMA)是测量物质在振动负荷下的变形与温度或时间关系的一门技术,它是在TMA基础上的进一步发展,但其设备不同。

DMA主要用于研究聚合物。与之相关的参数有储能模量和损耗模量,两者的比值即为损耗因子 $\tan\delta$,一般将其与温度作图。关于DMA在医药方面的应用,Craig和Johnson作了较为全面的论述^[42]。

扭辫分析(TBA)是将样品浸渍在玻璃纤维等的组合辫上,使之感受到一扭曲力。

6. 联用技术(结合技术)

材料物理特性的全面、详细描述常常需要各个学科一起来完成。单一技术无法全面描述药物特性。



热显微镜法或热平台显微镜法是用偏光显微镜观测样品在升温或冷却过程相态和表面形貌的变化的非常好的手段和方法^[43~45]，可以观测到脱溶剂化、熔融、结晶、共晶，甚至溶剂中悬浮物的形成。热平台显微镜法联用是一门新技术，如高分辨率彩色照相机，图像处理软件使得研究亚稳态、结晶特性以及解释其他方法更具吸引力。热光计用于测定光的强度和物体受热发光。傅里叶转换红外(FT-IR)显微镜^[15,45,46]和拉曼(Raman)显微镜^[47~49]是热显微技术非常好的辅助工具。显微镜、加热单元、分光镜都应进行校准。带有能量弥散-X射线探测器(EDX)的TEM(透射电子显微镜)和SEM(扫描电子显微镜)与DSC联用，用于研究固态反应。

最近诞生的，在1998年获得匹兹堡奖的TA仪器，源自原子力显微镜法的扫描热显微镜法，给测量物质热物理和热机械性能的仪器带来革命性的变化。该仪器已用于异丁苯丙酸的特性研究^[50]。

温度分辨X射线衍射仪具有加热小池，已广泛使用^[12,51~54]，它能够清晰认定晶相转变；如果由于动力学原因，本应在高温时才会出现的形状在室温时出现了，那么原位X射线衍射图谱可预测定量的方法。原位X射线衍射预计可用作定量法。低温X射线衍射小池在冷冻水溶液的研究上取得了较大进展^[55]。X射线衍射-差热分析(XRD-DTA)^[56]和在1999^[57]年丹佛X射线研讨会上展示的理学电机差示扫描量热仪-X射线衍射(DSC-XRD)的介绍，都证明了这种直接联用技术的优点。可变温度同步加速器的X射线衍射法可观测多晶型转变，结构数据可计算机处理，是一门有前途的技术^[58]。

TG可以和DSC联用。大部分公司提供TG-IR^[59]或者TG-MS^[60]联用仪器。最佳的协同化学分析采用TG-FT-IR，TG-MS和TG-GC-MS联用^[61]。图5为采用TG-MS研究草酸钙二水合物脱水 and 分解的图谱。脱水步骤首先转化为无水草酸钙，随后转变为碳酸钙，接着转变为氧化钙^[10,11]。图5表明样品中除结晶水外还含有部分自由水，同时TG-MS说明在分解过程中，有一定量逸出的CO转化为CO₂。

这些新出现的联合技术使得用极少的试样获取高度的信息成为可能。人们发现这是一个极佳的领域，在此可筛选(按ICH对多晶体研究的要求)合适的晶型，并对这种选择作出判断。

TG线对应于CaC₂O₄·H₂O失水后形成CaCO₃，接着转变为CaO。MS可检测到逸出气体。

热分析技术在药品上的应用

热分析技术观测到的转化是基于吉布斯相律在一定压力、温度和浓度下的相图。

DSC可测量有能量变化的转变和反应，而伴有质量变化的转变则可由TG测量。单一样品在加热过程中盐的形式和安全性均与DSC放热峰相关，它对比热容玻璃化转变、熔融、挥发、升华、分解和多晶转变是十分重要的。

建议利用DSC测量原材料的熔点^[20]。制剂中的水化物、溶剂化物和挥发物，可通过DTA与TG联用或TG-MS来研究；固体混合物的DSC曲线绘制取决于固态的相图。如果混合物之间没有相互作用，在熔融态互混，则可观察到该混合物的最低共融共晶现象，它可用于原料的纯度检测、分子间相互作用及对映异构体的研究。如果化合物在液态不易混合，那么混合物的DSC曲线是各个成分DSC曲线的叠加。如果生成固体溶液或成分间形成络合物或发生化学反应，则可观察到固态中组分的相互作用。

1. 多晶型/非多晶型和无定形

同质多晶现象使物质具有结晶成不同晶态物质的趋势，同一物质不同的固体形态称为多晶型物。在熔融后，它们产生同一种液体。同素异形体在液态或气态时属同一物质，但在固态时则呈现出不同物理性质。碳是众所周知的多形态物质，它能以石墨或钻石形式存在。

无定形态无有序结构，与液态相关。玻璃态是经过玻璃转化后无定形产物的名称。

伪多晶型适合用于描述水合物和溶剂化物。

在结晶或者药物处理过程中将可能形成不同的固相物质，如多晶型物、无定形态或与溶剂形成化合物的溶剂化物^[63~66]。

最近一份关于多晶型和伪多晶型的热分析详细评论中列举了超过300种药物存在这种状态^[67]。赋形剂的同质多晶现象及其热分析在文献^[68]中也有论述。

DSC不仅提供过程熔融时的温度，而且还提供熔融热焓。Burger规则和能量谱图^[69~74]有助于研究多晶型系统中热力学平衡。

对每一种多晶型物质(单一化合物)，都存在固-液平衡曲线和固-气平衡曲线。固-气曲线交于一点。如果液-气平衡曲线与固-气曲线交于两点且在固-气交点之后，那么将存在固态1和固态2两种平衡曲线，且在特定的压力下存在一个可逆转变点1↔2。这称为互变现象。在转变点，两种形态的自由能是一样的。

对于单个样品，比热、玻璃化转变、熔融、气化、升华、分解以及由于多晶型在加热过程中产生的相转变对盐的类型选择 and 安全性研究是重要的，这些性质与DSC放热峰是有关的。

术语单变性主要应用于不同形态间的不可逆转变。单变性仅限存于亚稳态的热力学状态。在液-气曲线相交形成两种状态之前，液-气曲线首先要与固-气曲线相交。

我们知道热力学量H(热焓)，G(自由能)，S(熵)，T(温度)之间的关系，对于每种形态，都可通过绘出温度-自由能图谱来简单地描述平衡状态。如果两曲线在熔融前相交，则是可逆性的，即互变现象，相反则为单变现象。

固相A和固相B熔融热焓与热量变化的关系为：

$$\Delta H_f = \Delta H_A - \Delta H_B$$

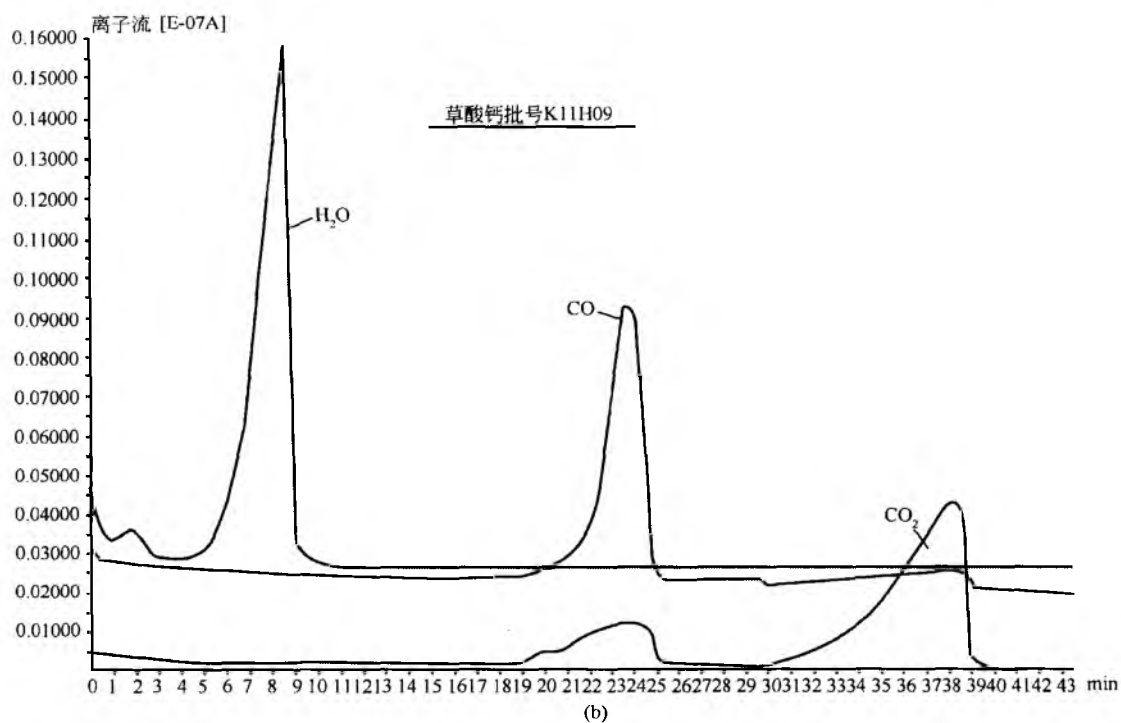
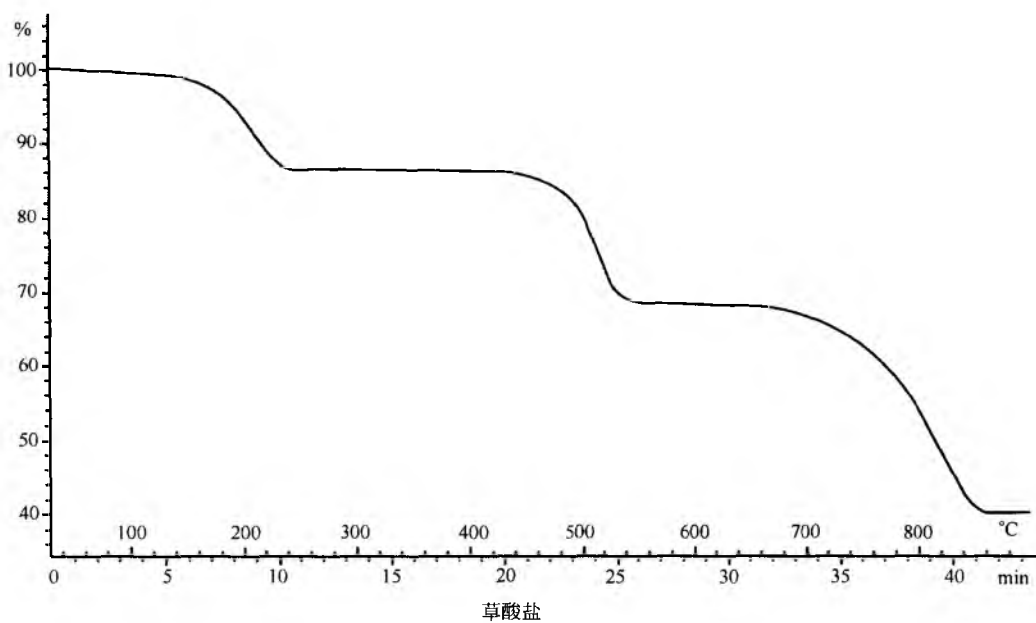
图5 $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的 (a) TG 和 (b) TG-MS 曲线

图6(a)和6(b)绘出了多晶型物和液体的自由能 G 和热焓 H 与温度关系(能量/温度图)的谱图。两种晶态的热力学可逆转变是互变体系的特征,每种形态都有其热力学稳定性区域。温度低于转变点时低熔点态稳定,高于转变点时高熔点态稳定。整个温度范围内单变体仅有一种形态是稳定的。互变体的Burger规则如下:熔点越低熔融焓越高,低熔点态通过加热转变成高熔点态为吸热过程。就单变性来说,热力学稳定态具有较高的融熔焓。不稳定

态转变成稳定态为放热过程。

由于动力学因素,在热力学范围外的温度区域中存在亚稳态。结晶过程通常意味着冷却浓缩溶液或者增加助溶剂使之沉淀。第一个晶核可能以亚稳态形式存在,这取决于亚稳态多晶型的溶解曲线和过饱和的亚稳态曲线的相对位置。它是否转变成稳定的晶态将取决于动力学因子。此外,在较低温度下溶剂化物的存在是不容忽视的,而可能形成的水合物应最终归于空气的湿度或溶剂中水的活性。

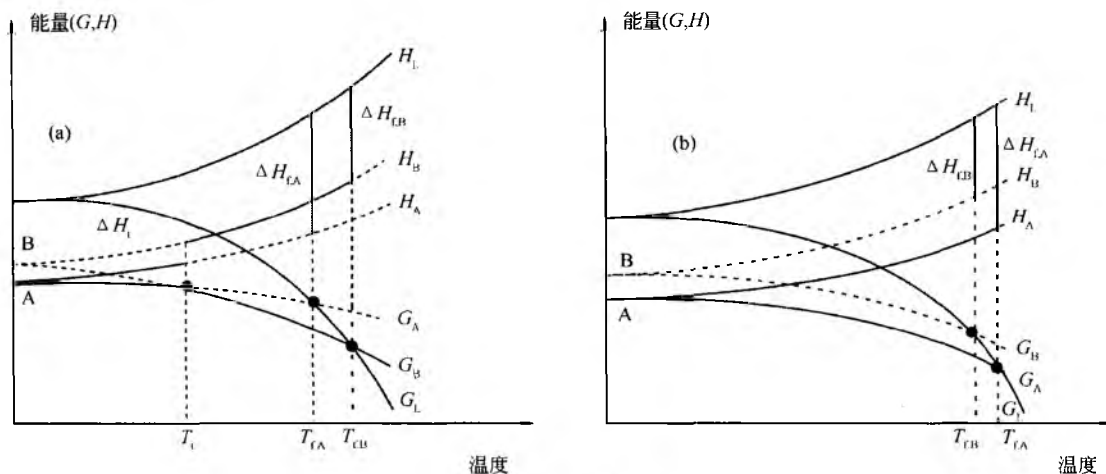


图6 单一化合物的固相和液相中热焓 H 和吉布斯自由能 G 对于温度 T 的关系图。(a) 互变现象；(b) 单变现象

溶剂化物和含水物的多晶型是普遍存在的。相伴的多晶现象最近已被报道^[75]。

图7说明了加热期间在互变[图7(a)]和单变[图7(b)]的情况下，多晶型物A和B的行为。为了得到所有随温度变化的分析结果，必须采用动力学因子对结果做出正确解释。室温下，样品处于稳态或者亚稳态的DSC曲线是有所区别的。A在两种情况下都处在稳态。

对于互变[图7(a)]情况，当温度低于转变点时仅存在A，随着温度的升高，其情形见DSC曲线1。可以观察到 $A \rightleftharpoons B$ 的吸热转变，其后为B的熔融峰。由于动力学因素，例如，在加热速率过快的情况下，将不发生 $A \rightleftharpoons B$ 的转变，A熔融。随后将出现两种可能，一是不产生任何信号，见DSC曲线2。或者因B的结晶而产生放热峰，随后将观察到B的熔融峰DSC曲线3。如果在转变温度前形成亚稳态B，通过加热，B可转变成A，此为放热转变DSC曲线4；其后，A态将转换为B态（曲线1或2）。最后（曲线5），B的亚稳态在没有发生任何转变情况下熔融。

在单变性的情况下[图7(b)]，当温度低于转变点时仅存在A，DSC曲线显示出稳态A的熔融峰（曲线1）。如果仅存在B，那么亚稳态B受热的DSC曲线如曲线2和曲线3所示。B转化为稳态A（放热峰）或者B熔融，随即生成稳定的A，继续升高温度会观察到A的熔融峰。

对于外消旋体，情况更为复杂化。因为只有一种外消旋多晶型体是真正的外消旋体，另一种则是密集体^[73,74]。另外还须考虑如包含体和类低共熔体的固相转变，这些都不是多晶型转变^[76]。

经常有一些物质存在两个熔点，由放热曲线隔开。其DSC曲线可能对应单变体也可能对应互变体，样品可为纯净物也可能是混合物。在DSC中利用不同的升温速率和回火，利用Burger规则，能够测量出熔点和熔融热焓。

TG曲线对于防止误判是非常有帮助的。McCauley^[77]描述羧苯甲酰胺磺胺噻唑的DSC曲线，DSC曲线上有两个吸热峰，之间是一个放热峰，TG曲线证明在第一个熔融峰时就发生了剧烈分解。降解产物经再结晶并在更高的温度下

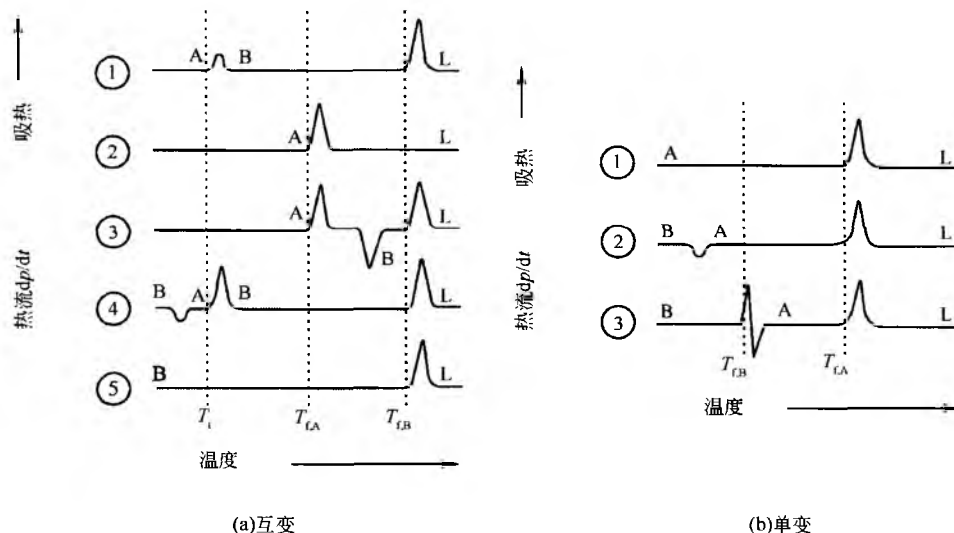


图7 两种多晶型物可能的DSC曲线：(a) 互变现象，B为最高熔融态，A为转变点下的稳定态；(b) 单变现象 $B \rightarrow A$ ，A为最高熔融态

R

熔融。我们观察到天冬甜素^[13]和丙二酸盐的相应碱^[12]的分解,就存在这种影响。如果发生异构化,那么只有依赖所获得的产物分析数据,才能得到准确的解释。

这些曲线表明了,在多晶体的加热或冷却过程中可能发生的复杂转变。因此,正如文献[54]所强调的,联用技术对于全面解释 DSC 所观测到的现象是非常有用的。图 8 为嘌呤类衍生物可逆互变的 DSC 曲线和分温 X 射线衍射图谱,发现该物质存在六种晶型。用于研究过饱和溶液和联

用技术的 Burger's 规则可以帮助我们确定图 8 中低于转变点的稳定态。而其他形态都为单变性^[78]。

表 5 中的盐酸苯并异喹啉在分解之前出现熔融,在慢速升温时观察不到任何变化。因为熔融热焓仅有 10% 的差异,验证是否互变转化才能给出正确的解释。对乙醇中两种晶型的平衡体系中不溶固体的分析(溶剂作为转化的媒介)显示经常获得 A 型,证实了 Burger 规则。

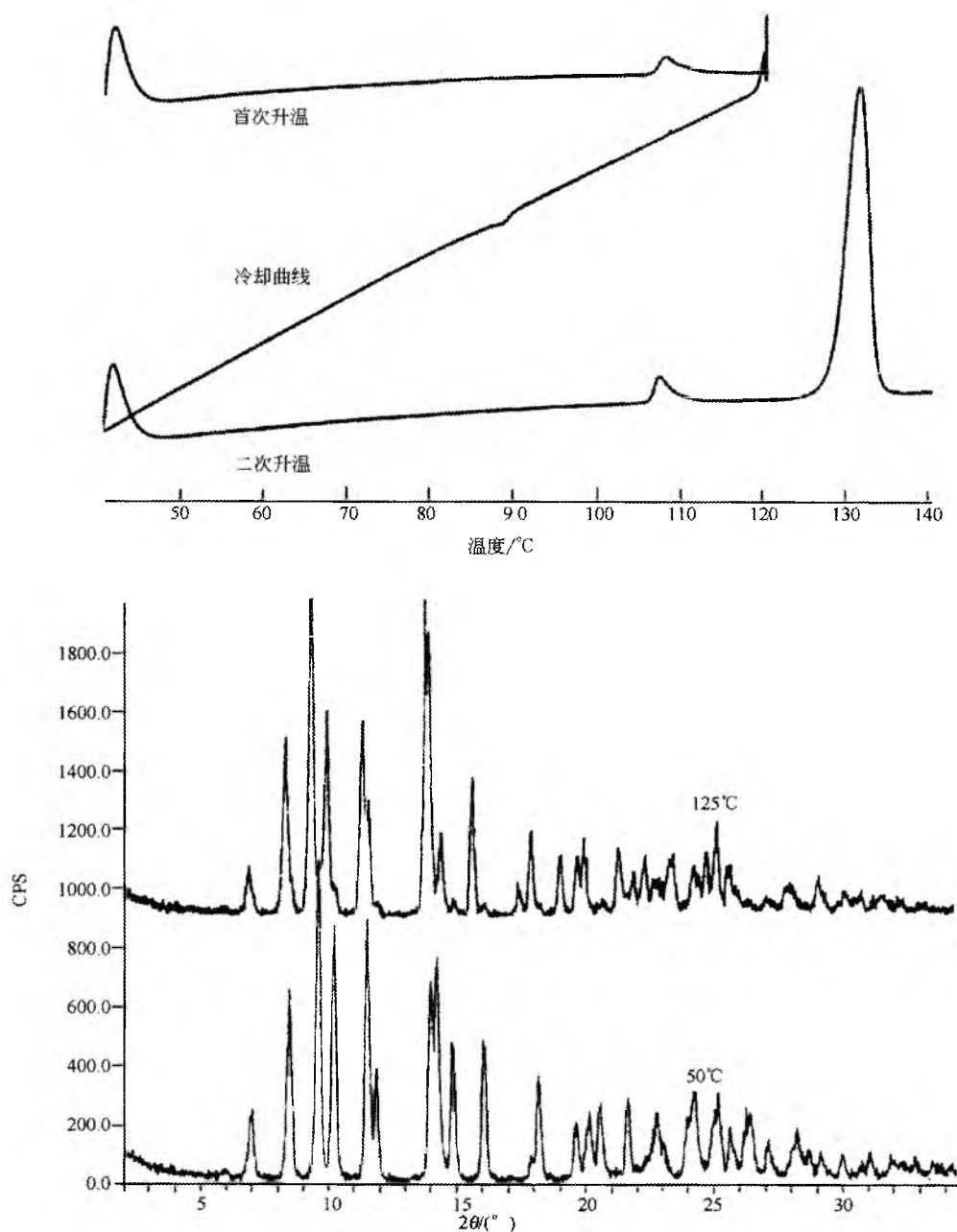


图 8 嘌呤类衍生物可逆转变的 DSC 图谱和不同温度下的 X 射线粉末衍射^[67]

表 5 两种多晶型物独特熔化曲线的研究

性质	晶型 A	晶型 B
熔点/℃	304	311
熔化焓/(kcal/mol)	12	11
相对湿度为 92% 条件下一天的吸湿量	0	3.2% (水合物)
乙醇中转化	A	B→A

2. 无定形态

如果绘出晶体的物理性质与温度的关系图,则在熔点处出现一个尖锐的中断。对于无定形物质,没有熔点,只是在玻璃化转变温度 T_g 处发生斜率的变化。玻璃化转变体现了热容的改变。在 T_g 温度以下,无定形具有晶体的部分性质(如塑性变形),称之为玻璃态;在 T_g 温度以上时,无定形态具有液体的部分性质,如分子运动,称之为橡胶态。温度高于 T_g 时,发生玻璃化转变之后,分子运动活性增加,易于释放出热量并形成晶态物质。无定形态的利用是很吸引人的,相对而言,由于无定形态的溶解性和溶出度都高于晶态的,因而提高了生物利用度。然而,无定形态处于热力学不稳定态。玻璃化转变温度 T_g 因加入水或者其他添加剂而降低,因此容易转变成橡胶状态,甚至容易结晶形成晶体^[79]。若要保持其无定形态,就需要确定其玻璃化转变温度及其状态,DSC 和调制 DSC 常用于此。Hancock 和 Zografi 集中研究了药物的无定形态并利用玻璃化转变的弛豫能、升温速率的影响,来研究“脆性”无定形态^[80~82]。无定形吡哌美辛的等温结晶利于形成哪种晶型取决于温度^[83]。

无定形的研究(对于药物和赋形剂而言)基于玻璃化转变的观测。图 9 显示了利用 DSC 来分析聚合赋形剂 Carbopol 974P 时玻璃化转变受加热速率的影响。通常在第一次扫描如果没有发生降解,则此次扫描期间表现为脱水和释放弛豫能,并显示出该纯样品的玻璃化转变温度 T_g 。然而,这种步骤不适用于研究介质的作用。

当无定形材料没有转变成晶体材料时,通过测量其熔融峰值并将之与纯晶体材料的熔融焓比较,可以得出混合物的结晶程度。如果无定形样品在加热时结晶,那么由其结晶峰可确定无定形的含量。如图 10 所示,在这种情况下,可获得 1% 检测限。

3. 伪多晶态

对于溶剂化物,给定压力下的溶剂(或水)的浓度对温度的二元相图有助于了解相转变。描述溶剂化物与水化物的性质需要同时使用 DSC 和 TG。脱溶剂化比较复杂:溶剂化物熔融后,放热重结晶成无水态或者蒸发时固态转变,也可能由于相转变的更迭而进一步吸热或放热。在如此复杂的情况下,利用 TG-IR 或 TG-MS 和分温 X 射线衍射等联用技术,对于在线鉴别挥发物组分或挥发性分解产物是极有帮助的^[54,67]。对于水合物,需要水的吸附-解吸附等温线及在潮湿容器下的 X 射线衍射^[54,84]。

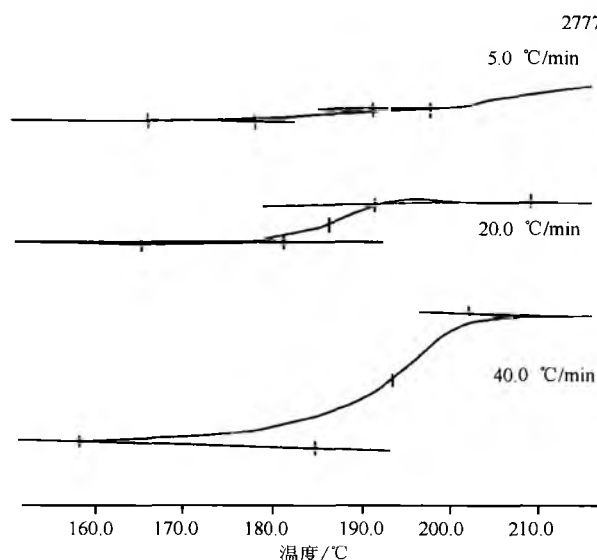


图 9 利用玻璃化转变温度控制赋形剂质量: Carbopol 974P。为了消除水分和加热速率的弛豫影响而进行二次差示扫描

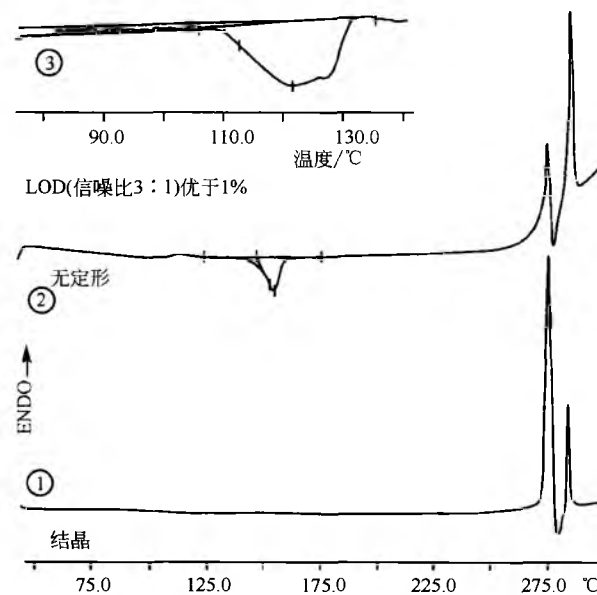


图 10 在 20K/min 下利用 DSC 确定无定形物含量。①结晶物;②无定形物;③由 DSC 计算的含 4% 无定形物的样品的放热曲线(通过信/噪比计算检测限)

溶剂化物和含水物的 DSC、TG 曲线与溶质和溶剂(水)之间的相图有关。能够观察到共熔^[85]。在升温过程中溶剂化物可能发生熔融或分解。因此,可观察到溶剂化物熔融后重结晶为无水态或在固态中因脱溶剂化而吸热。在一定情况下两种现象可能叠加,关于实验因素和实例的详细资料见文献[67]。如果无水态属亚稳态,则在脱溶剂化后可发生进一步的相变。如果有几个溶剂化物或水合物存在,其转变将取决于压力,如 Soustelle^[86]报道的五水硫酸铜就是如此。根据压力的大小,直接脱水为无水物或由

一水合物脱水为无水物,或者由三水合物三步脱水,得到一水合物和无水物。在文献[87, 88]中有几篇以水合物为主题的评论。水合物的多晶态是常见的^[89],图11说明了一个药物的三水合物的多晶态行为。无水物显示了双重熔融峰(互变现象)。在室温下该相态极易吸湿并转化为三水合物 H_I ,该三水合物的 DSC 曲线显示在固相有一个脱水峰,接着再扫描显示如原有的无水型。在类热带气候条件下(30℃/75% RH)储存几个月后,可得另一三水合物 H_{II} 。该三水合物 H_{II} 可通过水中结晶或者原无水物在饱和水溶液中达到平衡后获得。该三水合物 DSC 曲线与原先水合物的区别在于脱水后形成新的无水物。该解释通过 X 射线衍射、Wolff 图表、纯度分析、Karl Fischer 和 TG^[10, 67] 得到验证。

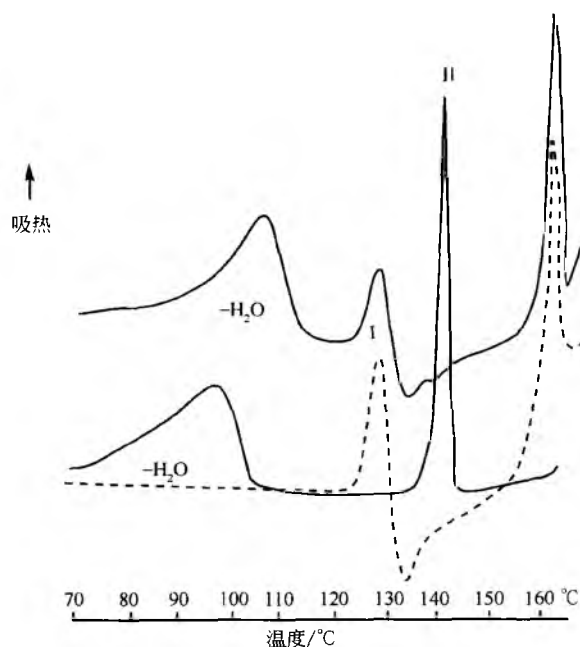


图 11 三水合物的多晶型现象^[10]

经常检测不到溶剂化(水合),因为根据相图,在室温下,溶剂化物(水合物)能部分或全部离解。在水中,水合物的悬浮物将改变平衡,使之向形成稳定水合物的方向转移。DSC 可在低于环境温度的情况下检测相变。Giron 等^[90]建议根据样品中水的熔融峰来分析水中药物的悬浮液,结合 TG 来分析水合物中水的分子数。

4. 转变研究: 动力学

因为在磨制、工艺和老化过程中可能发生晶型转变,热分析技术广泛用于所有转化的动力学研究。任何动力学研究的目的是通过比较一系列不同时间段测得的转变分数来获得关于反应机理方面的信息。大部分固态反应机理为成核期,一个生长区域和一个未反应核。对于多晶型或伪多晶型转变,仅适用非均相动力学(至少两种形态或两相)。在非均相动力学中需要考虑大量因素,如样品温度梯度、粒径、活化作用、成核和扩散。

热分析技术动力学方法概述见文献[67]。

5. 微量热技术

溶液热量测定可研究包括热焓改变在内的一些过程。绝热微量热法和恒温量热法可用于批量体系或流动体系的溶液热量的精确测量。反应物的混合主要通过破坏反应物的主体使其混合或者在一个特殊的器皿中将反应物混合。

如果一种化合物存在两种或更多的具有不同晶格能的晶型或无定形,在任何给定的溶剂中所形成的热溶液也将不同。假如固体化合物的化学成分相同,那么溶液热量的差则等于固体晶格能量之差,例如,我们测量一种药物两种形态的水溶液能量,其差值为 9.7 kJ/mol,非常接近于通过 DSC^[54]所测得的两者熔融焓之差 9.1 kJ/mol。DSC 的信息更好,因为是可以测量三种形态的熔点温度。由于低熔点的形态其熔融焓也低,因此处于稳定态,这两形态为对映异构关系。综述请参阅文献[67]。

Byström^[91]开发了一门通过等温微量热法测定药物结晶度的技术。由于药物粉化时产生无定形物态, X 射线衍射不能测量出来,因此需要建立一个可用于分析批产品质量的分析方法,其测量原理基于高湿度条件下晶态物质中无定形态的转变。无定形物吸附水分,且玻璃化转变温度降低,结晶速度加快。通过等温微量热法可测定能量与时间的关系。其结果比得上 X 射线衍射的测量结果,但检测限可能低得多(优于 1%)^[54, 92, 93]。

6. DSC 纯度测定

量热纯度测量方法是以物质熔点的降低和根据 van't Hoff 方程确定的杂质含量为基础的。不需要药物及其杂质的标准样,仅仅从几毫克样品的单一的 DSC 熔融曲线就可轻易地计算出样品纯度。

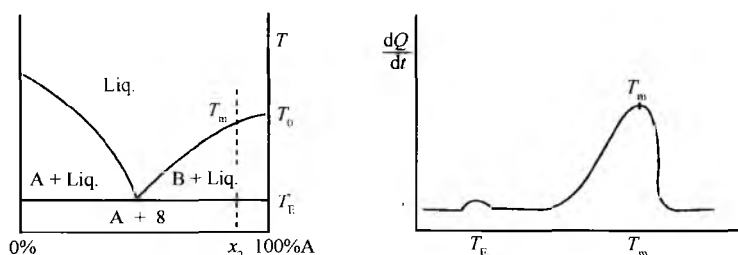
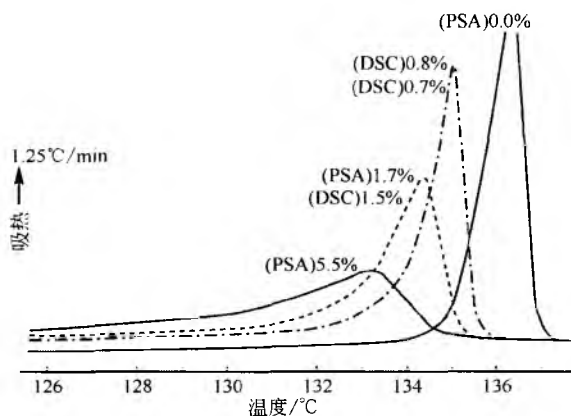
DSC 纯度测定在 USP 中有论述。现代热分析仪器具有自动控制系统和数据采集系统, DSC 纯度分析代表着药学发展的技术水平。

通过用 DSC 方法进行的纯度测量是在假设杂质使纯物质的熔点下降的基础上建立的,依据低共熔相图来实现。

图 12 所显示的是具有低共熔点的二组分混合物的相图。在低共熔点 E (例如, 40% 的 A, 60% 的 B), 晶体 A 和 B 在温度 T_E 时熔融, 该温度低于纯样品的熔点。如果加热 A 和 B 混合物 (例如, A 占 90%), 起初观察到低共熔混合物的熔融 (A 占 40%), 直到所有的 B 被熔融。在低共熔体 (40% A, 60% B) 的熔融过程中, 部分 A 随 B 一起熔融, A 相应的量为 $\frac{2}{3} \times 10\%$, 即 6.67%。然后随着温度升高, 纯样品 A 在 T_E 和 T_m 之间熔融。 T_m 为熔融结束温度。

对应的 DSC 曲线上, 在低共熔点可观察到一个吸热峰, 然后晶体 A 开始熔融。杂质对 DSC 曲线的影响是熔点降低以及熔融曲线的熔程变宽 (图 13)。

根据熔点的下降量 $\Delta T = T_0 - T_m$, 可计算出杂质的含量。

图 12 低共熔混合物的二元相图及组成为 x_2 时的 DSC 曲线图 13 杂质对 β -羟基-丙基茶碱熔融曲线的变宽作用。PSA 为相溶解分析。所有批次都有相同的 TLC 纯度^[6]
稀溶液的 van't Hoff 公式为

$$x = \frac{-\Delta T \cdot \Delta H_f}{RT_0^2}$$

式中： x 为杂质的摩尔分数； ΔT 为熔点的降低量； ΔH_f 为纯样品的熔融焓； T_m 为样品熔点； T_0 为纯样品的熔点； R 为摩尔气体常量。

DSC 程序不直接测量 ΔT ，但是可从熔融曲线上计算出

来。在低共熔点，所有的 B 都为液态。在低共熔点后及 A 的熔融过程中，液相中 B 的浓度在改变，导致了 DSC 曲线熔程的变宽。在没有固体溶解的情况下，熔融期间任何温度下的液相中杂质的浓度与该温度下的熔融分数呈反比。熔点的下降与杂质的摩尔分数成正比。DSC 曲线样品熔融峰的各点温度 T_i 和该温度下的熔融分数的倒数 $1/F_i$ 存在线性关系，其斜率等于熔点的降低量 ($T_0 - T_m$)。纯样品的理论熔点 T_0 可通过外推至 $1/F_i = 0$ 获得：

$$T_i = T_0 - \frac{RT_0^2}{\Delta H_f} \left(\frac{1}{F_i} \right) x$$

这一关系式可表达成：

$$T_i = T_0 - \Delta T \left(\frac{1}{F_i} \right)$$

用实验值代替第一个等式中的 ΔT 、 ΔH_f 和 T_0 ，得到杂质的摩尔分数，再乘以 100，即得到总的共熔杂质百分比。

每点温度 T_i 为样品温度，而不是程序温度，从而导致热滞后，所以对仪器的各温度点进行校正。

将熔融曲线划分为多个区域，且每一区域的面积为 S_i ，则熔融分数 $F_i = \frac{S_i}{S_{total}}$ ，计算出每点的熔融分数，并画出 T_i 与 $1/F_i$ 的关系图，其中 T_i 是分数为 F_i 时的温度（图 14），可以计算出斜率 ΔT 和纵坐标 T_0 。

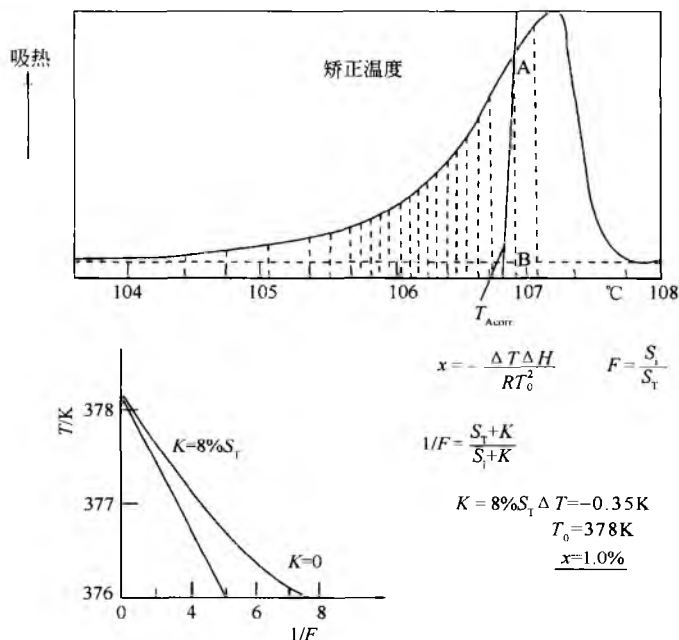


图 14 通过 DSC 计算纯度

因为没有测定最低共熔点,所以上述曲线一般不为直线,因而必须给每段曲线引用一个校正因子 K 加以修正;也可能与熔化过程中固体溶液的形成或假象有关。

$$F_i = \frac{S_i + K}{S_{\text{total}} + K}$$

生产厂商的软件大部分使用迭代法线性化,这样可以得到一个最佳的 K 值。此测量手段具有如下特性:

- 测量杂质,且具有低共熔性(即液相中可溶解而固相中不溶);
- 杂质含量应 $\leq 2\%$;
- 结果以摩尔百分数 (mol%) 表示,不需要知道杂质的相关情况;
- 不需要纯样品;
- 使用少量样品 (1~2mg, 甚至更少);
- 如果在熔化时发生分解,则可能得到错误的结果;
- 不用 1 小时即可获得纯度结果。

Giron 等^[94]详细讨论了产品参数和仪器参数对测量结果的影响,并提议为 DSC 纯度测量建立一个验证的方法。作者们展示了该方法对层析技术的支持,如为在强化条件下原料稳定性研究而进行的纯度监测,又如确定纯度概况等。图 15 为对湿度敏感的药物稳定性情况的 DSC 曲线。

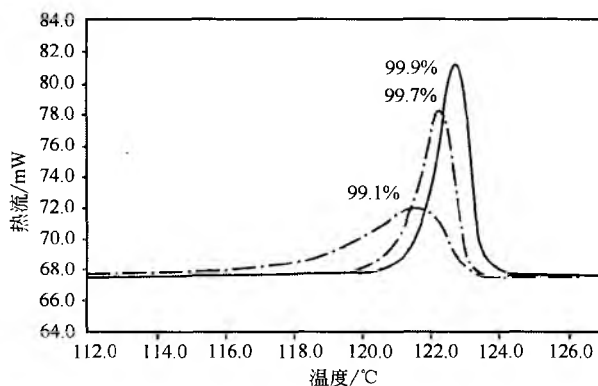


图 15 稳定性筛选。对湿度敏感药物的 DSC 纯度结果。由上至下依次为:最初样品(纯度 99.9%),在 50℃ 潮湿环境下储存的样品(纯度 99.7%),在 80℃ 潮湿环境下储存的样品(纯度 99.1%)

7. 对映异构体

对映异构体为立体异构,彼此之间为镜像异构。等分子数的两种对映异构体的混合物称为外消旋体。外消旋存在

三种不同晶型。第一种为密集体,即由两种固相形成的纯对映异构体晶体的机械式混合物。最普遍的类型为外消旋化合物,由等量的对映异构体混合而成,仅仅由一种晶型组成。第三类型是伪外消旋体。即这两个对映异构体都存在的固体溶液。

密集体是由等分子数的两种晶型的对映异构体组成的混合物,可通过结晶轻易地将其分离开。在固态时存在两相,在液态时只存在一相(可互溶性)。Schröder-Van Laau 以简单的形式将混合物的组分与熔融结束温度 T^f 联系起来:

$$\ln x = \frac{\Delta H_A^f}{R} \left(\frac{1}{T_A^f} - \frac{1}{T^f} \right)$$

其中: x 为熔融温度为 T^f (以开尔文温度表示) 时混合物中含量较多的对映异构体的摩尔分数 ($0.5 \leq x \leq 1$); ΔH_A^f 和 T_A^f 分别为熔融焓和纯的对映异构体的熔点; R 为气体常数。

外消旋化合物,或真正的外消旋物,显示两个低共熔点,每个共熔点都在纯对映异构体熔点和外消旋化合物熔点之间。DSC 曲线形状的变化,取决于低共熔温度的相对位置、外消旋化合物和低共熔物的成分 [图 16 (b)] 和 [16 (c)]。对于图 16c 中的情形,通过 DSC 来辨别密集体和外消旋化合物是困难的。其他方法如 IR (红外) 或 X 射线衍射可以做出正确的解释。例如,盐酸普萘洛尔作为密集体或外消旋化合物分别在文献 [95, 96] 中已有描述。用于计算液化曲线的 Schröder-Van Laau 公式,可应用于纯对映异构体和对应的低共熔体之间的液化点的计算 ($T_A^f E_R$ 与 $T_A^f E_S$) 对于 $E_R E_S$ 部分,应用 Prigogine 和 Defay 公式:

$$\ln 4x(1-x) = \frac{2\Delta H_A^f}{R} \left(\frac{1}{T_A^f} - \frac{1}{T^f} \right)$$

其中: x 为熔点为 T^f 的混合物中对映异构体的摩尔分数; ΔH_A^f 、 T_A^f 分别为外消旋化合物的熔融焓和熔点。外消旋化合物和对映异构体可出现同质多晶现象。单变或互变的相图在文献 [75, 76] 中已有讨论。相当有趣的是,外消旋化合物转化为密集体,利用这一点可以通过结晶起到提纯的作用,参照文献 [97]。DSC 可应用于建立相图,热力学数据测量^[98], 纯度测量以及监测工业拆分。辅以光谱和结晶方法将更利于相图的建立^[99]。

两种方法可用于纯度检测:直接法或间接法^[75]。直接法可用于通过 Schröder-Van Laau 和 Prigogine-Defay 公式来构建相图的混合物。对于高纯度的对映异构体 ($>95\%$),可用常规 DSC 纯度方法测量低共熔杂质,但仍存在同样的

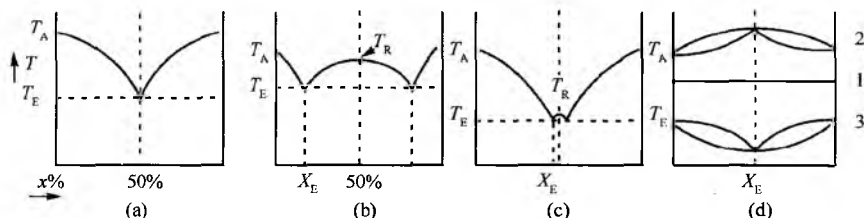


图 16 对映异构体的相图: (a) 密集体; (b) 和 (c) 外消旋化合物; (d) 固体溶液



局限性(在熔融时出现多晶和降解现象),测量结果得到的是杂质总的含量,不能区分不同的杂质。对于纯度大于95%的情况,间接法和直接法可以获得相同的结果^[100,101]。

通过结晶或夹带技术,可以方便地提纯密集体,见 Jacques 等的论述^[75],其中包括把所需对映体的晶种引入到外消旋混合物的冷却的饱和溶液中。根据作者的观点,有三个阶段会形成密集体,最为常见的是成盐期,因此这有利于比较不同形态盐的行为。另一方面,对于包含几个步骤的合成来说,为选择表征密集体行为的步骤从而有效地拆分对映异构体中,有必要研究每一步骤的行为。对于外消旋化合物而言,夹带技术可用于低共熔点非常靠近外消旋物的情况。这突出了系统地寻找形成密集体的衍生物或低共熔点接近于外消旋体的共熔化合物的重要性。

另一个进一步的提纯方法是形成非对映异构体盐。然而,经常发现会形成部分固体溶液且难于达到高纯度。利用 DSC 曲线的一部分来拆分非对映异构体盐已有讨论^[102]。

在草本制剂中,存在着从外消旋体到对映异构体的转变,普洛萘尔对映异构体的皮肤表层的渗透性强于外消旋化合物,这可通过熔点降低得到解释^[103],其中布洛芬的立体特性也已论述了。利用 Schröder-Van Laau 和 Prigogine-Defay 公式,可由(十)对映异构体和外消旋化合物的 DSC 曲线,计算出理论相图。实验结果证实了计算数据^[104,105]。对映异构体的低熔点可用于制药工艺过程。在文献[106]中讨论了手性药物物理性质与晶体结构之间的关系。

热分析技术在药品中的应用:处方前、工艺及老化

处方前研究包括药物的多晶型和盐类的选择。应考虑其熔点、可溶性、溶出性、吸湿性、稳定性、可行性、可加工性和多晶行为。第二步研究在赋形剂存在时药物的行为^[107]。

1. 赋形剂

热分析技术在医药中的应用受制于对赋形剂的热行为的认识。大量出版物讨论赋形剂的多晶行为特别是无定形态,作为冷冻干燥和制粉过程的必备知识。

乳糖存在 α 和 β 二种异构体。除了无定形态,还可能获得 α -一水合物、 α 和 β 两种无水晶体。类型不同,其药物性质是不同的。利用冷冻干燥法产生的无定形乳糖获得的药片的硬度是采用结晶态的 10 倍。在研磨过程中,可观察到一水合物失去部分结晶水。乳糖不同的热处理将产生无水物、不稳定的 α 态及比例为 1:1 的 α 和 β 态的晶体。在高湿度的影响之下,无定形乳糖出现结晶,而无水态将倾向于变回一水合物^[68,108,109]。

在文献[68]中,对不同形态的山梨醇、甘露醇、葡萄糖、硬脂酸镁的热分析研究进行了论述。硬脂酸镁除了无定形态外,还存在一水合物、二水合物和三水合物。依

照 Wada 等的观点^[110],热分析是用于表征硬脂酸镁的最佳方法。

热分析广泛用于聚合体和共聚物分析^[4]。可对玻璃化转变、熔融、分解过程等进行分析。由于在玻璃化转变温度 T_g 时样品的热容、膨胀系数和硬度都发生显著的改变,因此除了 DSC 外,也可以使用 TMA 技术。分子量增加到一定值, T_g 升高。增塑剂和水可降低 T_g 。在氧气气氛下,可利用 TG 或 DSC 来研究样品的热稳定性以及抗氧化剂与装填物的影响。

通过比较各组分的 DSC 曲线,可测试混合体系中聚合物的相容性。不相容的结晶混合物如聚乙烯-聚丙烯,则显示出聚乙烯和聚丙烯的各自的 T_g 峰。而相容性无定形混合物可观察到两个玻璃化转变和混合物的一个新的玻璃化转变。部分相容性混合物也存在二个玻璃化转变点,且位于众聚合体的玻璃化转变点之间。目前有多种不同的方程,如 Gordon-Taylor 方程,可表达新的玻璃化转变 T_g 与各组分玻璃化转变点 T_{g1} 和 T_{g2} 之间的关系, W_1 和 W_2 为质量分数。 K 为 $\Delta C_{p2}/\Delta C_{p1}$ 之比。

$$T_g = W_1 T_{g1} + K W_2 T_{g2} / W_1 + K W_2$$

聚合物主要用于药物的包装中,如聚乙烯、聚丙烯、聚氯乙烯、聚酰胺、聚苯乙烯、尼龙、醋酸纤维及相互间的混合物,药物包装材料中也要用到共聚物和橡胶。作为包装用的聚乙烯,其 DSC 熔融曲线是典型的。低密度和高密度的聚乙烯可以通过熔点来区分^[111]。聚乙烯的熔点和密度呈线性关系^[112],结晶度可按上述无定形态进行测定。

聚乙二醇(PEG)可利用热分析方法进行全面、集中地表征,PEG 的熔点随着相对分子质量的增加而升高,随以低共熔态形式存在的水的含量的增加而降低^[10]。Corrigan^[113]研究了 PEG 不同的 DSC 峰形:PEG 6000 中存在折叠晶体和伸展晶体,而形成了 DSC 双峰。在相对分子质量较高的 PEG 中,仅存在折叠晶体。在相对分子质量较低的 PEG 中,仅存在伸展晶体。Craig 在文献[114,115]中对 PEG 的热性能,包括其水溶液的性质做了论述。PEG 4000 的相图最近在文献[116]中也有论述。相对分子质量较高的 PEG 通常用于固态分散系统,其熔融行为与药物制备的温度有关^[5,117]。

玻璃化转变可用于鉴别不同相对分子质量的聚乙烯吡咯烷酮^[10,118]。水分降低了聚乙烯吡咯烷酮的玻璃化转变,并影响其物理特性, Tan 和 Challa 在文献[119]中加以了证实。

为了食品和医学方面的应用,进行了大量的纤维素衍生物的研究^[120~123]。由于存在宽范围的脱水吸热峰,玻璃化转变的测量往往是比较困难的。图 17 显示了含水量对羟丙基甲基纤维素 HPMC 4000 玻璃化转变的影响。

为得到合适的薄膜,薄衣加工需要具备玻璃化转变的数据。在文献[124~126]中进行了乙基纤维素,邻苯二甲酸纤维素,乙烯聚合物乙醇,聚甲基丙烯酸甲酯及异丁烯酸盐等的研究,同时也讨论了形成薄膜的关键参数。

在食品和生物工程学中,为多聚糖在喷雾干燥产品中

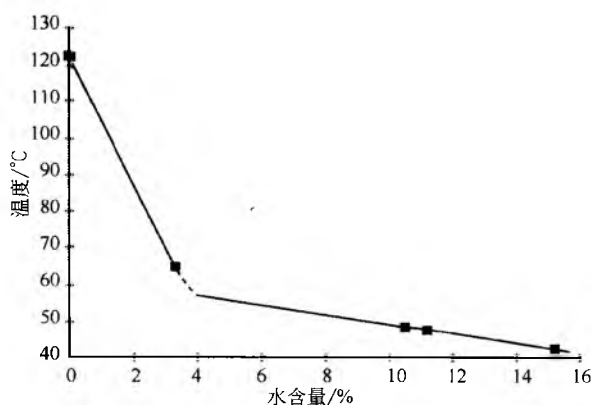


图 17 在密闭器皿中通过 DSC 测量 HPMC 4000 含水量对其玻璃化转变温度的影响

的应用,专门进行了多聚糖和水的相互作用的研究^[127~129]。

生物降解聚合物为结晶型或无定形。Pitt 和 Gu 对聚-L-乳酸和 D, L-聚乳酸进行了研究^[130]。图 18 所显示的是聚-L-乳酸在淬火后第二次升温的扫描曲线。在玻璃化转变之后,依次出现结晶、熔融。Akkar 等对生物降解聚合物的老化和结晶进行了研究^[131]。TG 用于测量夹带的溶剂(通常为二氯甲烷)和潮气^[5,10]。包含生物降解聚合物的微球体成了热分析的热点,通过热分析技术可以得到聚合物的玻璃化转变点和待分析药物的物理性质。热分析技术通常结合电子显微镜一起使用,用于药物装填与工艺的最佳化^[132]。聚合物的物理老化可通过 DSC 曲线中介质的玻璃化转变的大小来评估。伴随老化的进行,弛豫能也增加。Rosilio 研究了黄体酮聚合物(D, L-lactide-co-glycolide)的

微球体。老化影响已装填药物的固体状态。根据共聚物的组分,可得到不同的多晶型^[133]。

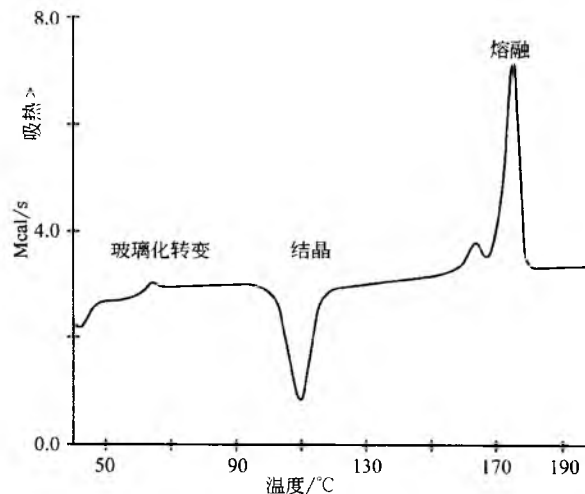


图 18 熔融态淬火后 L-聚乳酸的 DSC 曲线^[10]

2. 相图

热力学相图是理解制剂的 DSC 曲线的基础,这些制剂包括:低共熔体、固体溶液、具有部分固体溶液的共熔物和形成相同或不同熔点的化合物。图 19 示例了使用 DSC 曲线构建异丙基安替比林和丁基-萨米得的相图。为减少 DSC 扫描次数,可借助理论曲线。药物/硬脂酸的相图,观察不到盐的形成^[13]。最近热分析已用于丙醇/油酸复杂的相图研究^[135],发现盐和中间相的形成。

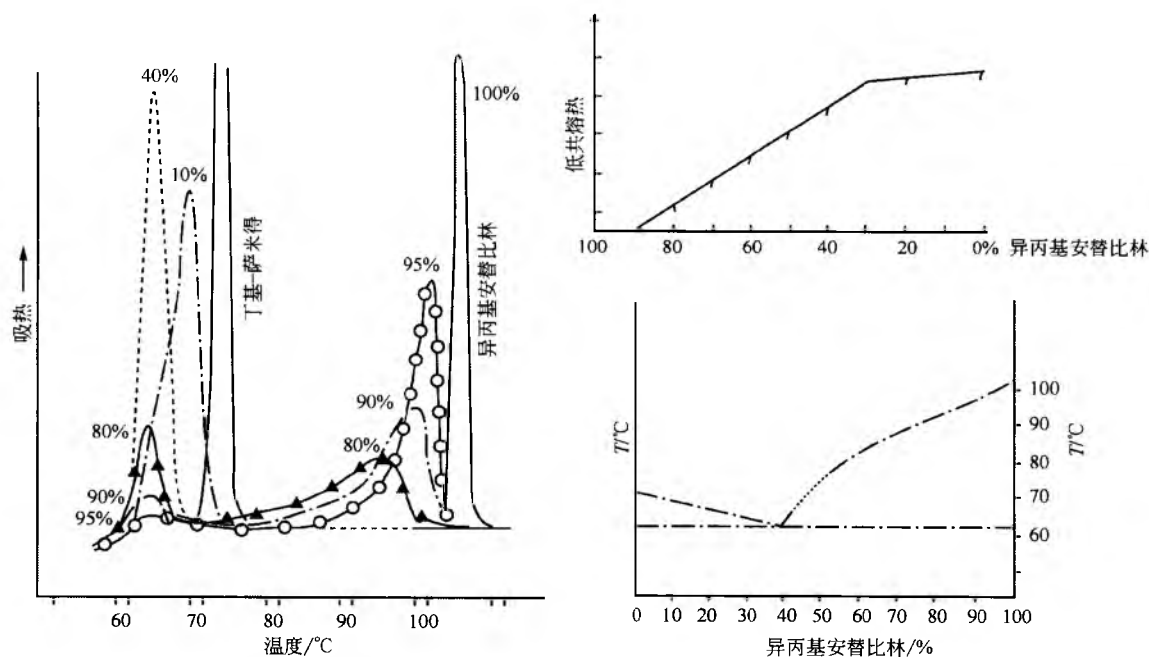


图 19 利用 DSC 曲线构建异丙基安替比林和丁基-萨米得的相图^[6]

有人建议通过比较各组分与混合物的 DSC 曲线, 将 DSC 用于相容性研究。不幸的是, 这可能会发生一些误解: DSC 曲线仅反映样品物理特性, 而低共熔体并非是不相容的。此外, 在混合物的熔融温度, 水通常是不存在的。Giron 等^[9]完成了一些药物和赋形剂, 混合物初始的 DSC 曲线以及在 50℃/ <30%RH、50℃/75%RH 的环境下储存一

个月后的 DSC 曲线。在药物的化学分析中采用了色谱法。图 20 对不同混合物的 DSC 曲线进行了比较。湿度对药物降解的影响显著: 药物与硫酸钙微晶纤维素和硬脂酸等混合时完全分解。与滑石粉和磷酸二钙混合, 没有降解。观察五种赋形剂的初始 DSC 曲线, 会误认为它们具有同样的相容性。

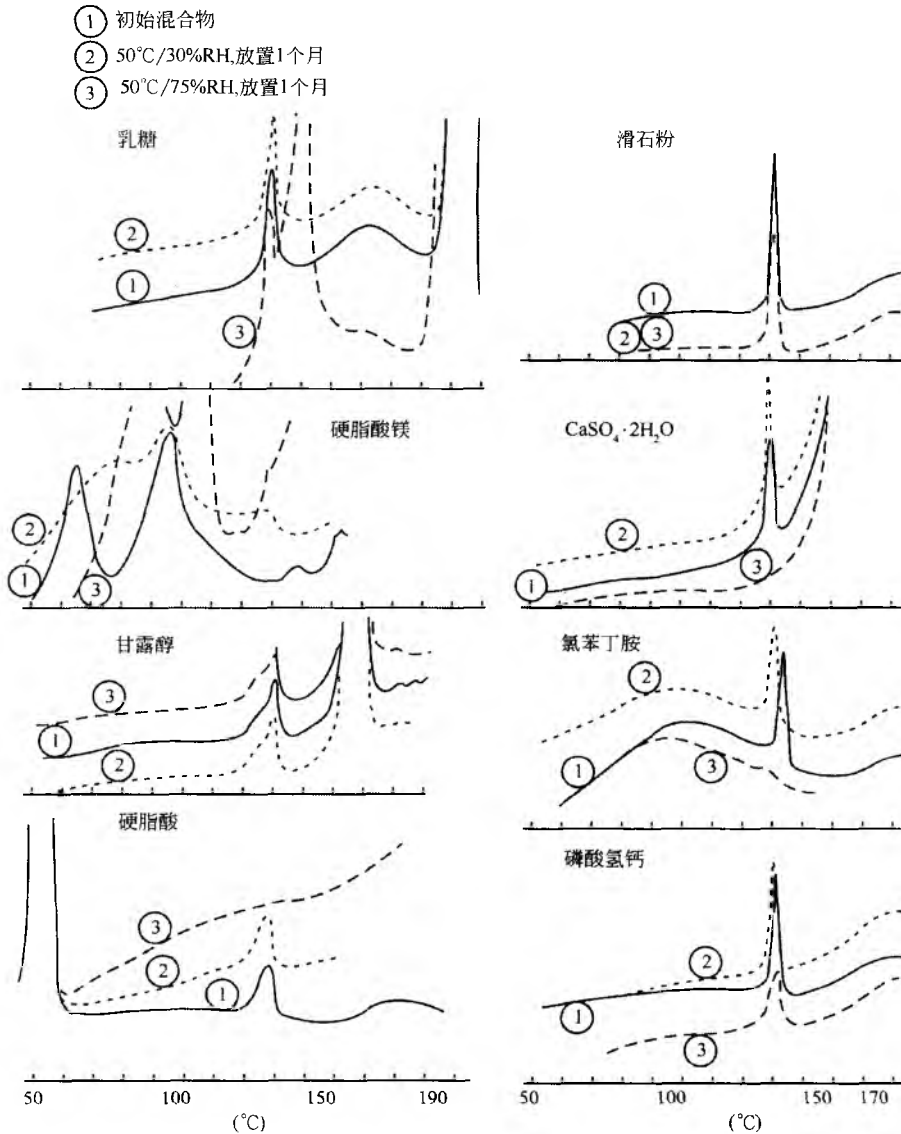


图 20 含 10% 药物赋形剂的 DSC 曲线: ① 初始曲线; ② 经过 50℃/30%RH 一个月后的曲线; ③ 经过 50℃/75%RH 一个月后的曲线。初始 DSC 曲线显示了药物仅与甘露醇和硬脂酸镁之间的不相容性。曲线 3 显示了经过 50℃/75%RH 一个月后赋形剂的区别: 药物与硬脂酸、二水硫酸钙和微晶纤维素混合发生降解

对于此类相容性的研究, 有人建议采用等温微量热仪 (实例见文献 [136])。

为获得相关信息 (如, 在环境温度下低共熔体是否熔融), DSC 对药物和赋形剂混合物的研究非常有用。另一方面, 人们可能注意到: 因为赋形剂可以是固体分散、固体

溶液或形成络合体, 彼此间将可能发生相互作用。载体的选择决定分散的药物的溶出度的特性。弱水溶性活性成分通常与水溶性载体结合, 可增加活性成分的分散能力。水溶性好的药物通常与微溶性载体结合, 可以延迟药物从基质中的释放。关于固体分散的评论, 见文献 [5] 和

R

[137]。为了固体分散剂的开发,应考虑制备方法、系统类型、溶出特性和老化问题。通过对纯化合物、物理混合物和熔融态混合物的 DSC 曲线与固体分散的 DSC 曲线的比较, DSC 可用于固体分散的研究。TG、X 射线衍射和联用技术可以辅助 DSC 的研究。从相图中可观察到赋形剂的亚稳态、具有玻璃化转变的无定形态、药物的亚稳态。

在图 21 中, 达罗地平-聚乙二醇 6000 的相图是根据 DSC 曲线来绘制的, 采用了两种实验方法^[10]。第一种方法是通过研磨获得的物理混合物在刚完全熔融后冷却, 再以 5K/min 的升温速率进行 DSC 实验, 进行第二次扫描。第二种方法是将混合物溶解于甲醇中, 并将溶剂蒸发。两种方法可获得相同的结果。

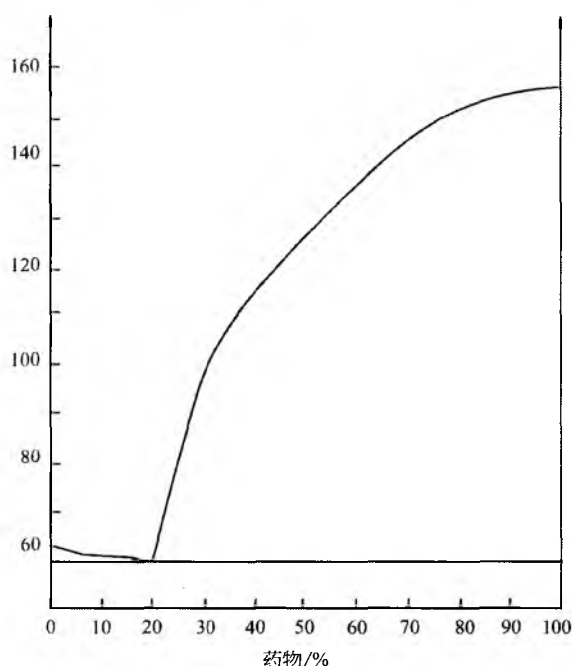


图 21 达罗地平-PEG 6000 的固态分散相图

根据相图的相关知识, 可进行工艺温度的选择。可选择最低共融组成高的份额, 一旦制成固体分散体并加以磨细, 通过测量低共熔体的熔融焓, DSC 将非常适用于检查批量生产产品的稳定性和重复性。对于 40% 达罗地平的固体分散体, 低共熔体的熔点为 58℃ 时, 其标准偏差为 1.4%。27cal/g 的低共熔体熔融焓的偏差为 2.4%。

用于固体分散的 PEG 相对分子质量在 1000 到 20000 之间。低相对分子质量的 PEG 为液态, 因此不合适。故使用最多的是相对分子质量在 4000 到 6000 的 PEG。大部分药物低共熔体的组分都处于比较低的浓度。一些偏晶 (0% 药物) 已经被描述。在文献 [5] 中, 获得的一个最高含量的低共熔物中药物 Glutethimide 占 32%。

固体溶液: 在固态中, 药物和载体易互溶。不同相对分子质量的 PVP 通过憎水作用溶解不溶于水的药物如安定^[138]。DSC 峰的裂分表明固体溶液的形成。

药物及其载体都可处于玻璃态。用 DSC 方法可观测出完全互溶、部分互溶和完全不互溶。这些体系对温度和湿度是非常敏感的, 经过较长的储存期之后, 可以经常观察到结晶现象。

淀粉新的衍生物, 主要是环糊精^[139], 能形成包含物, 是用于监测药物溶出特性的最佳载体。这些环式低聚糖包含 6(α -CyD)、7(β -CyD) 和 8(γ -CyD) α -(1, 4)-连接葡萄糖单元。在最近十年, 人工制造出了大量的化学改进的环糊精。通过包含在腔体中或者通过化学基团的相互作用形成复合物。为获得复合物, 必须首先在熔液中结合。通常制备方法有: 混合、共沉淀、冷冻干燥或喷雾干燥。喷雾干燥法常可以得到最好的结果。

Giordano 等^[140]设计了一种计算客体/主体比的方法。在客体赋形剂分子过剩的情况下, 他们对不同组分分散性进行了 DSC 分析。赋形剂分子熔融峰中残留的能量可用于计算游离药物的量。将不同配比 (1:1, 1:2, 1:3) 的混合物中游离药物的量与赋形剂分数作图, 并将该曲线与理论曲线进行比较。

在通常情况下, 药物的 DSC 峰消失, 且观察不到新的峰。而对于丁酸氢化可的松^[141], 可观察到对应于该复合物的一个新的峰。对于这类药物, 配位作用强弱顺序为: α -CyD > β -CyD > γ -CyD > 二甲基- β -CyD。此外, 也运用到热重分析法^[142]。由于络合作用, 气化、升华以及药物降解的温度随之升高。

3. 药物产品分析

如果药物的各成分在固态或者在液态中不易混合, 那么它们的 DSC 峰保持不变。这可用于鉴别药物产品的成分, 跟踪多态晶的老化问题, 或可用于药物与赋形剂的定量分析^[11,20,143,144]。

4. 脂肪酸和甘油酯的衍生物

大多数脂肪酸及其类似化合物显示出多晶现象, 包括脂肪酸、鲸蜡硬脂酸、甘油酯、油、氢化油、反式硬脂油、栓剂等^[145]。这种多晶型行为以老化导致熔融的变化为特征, 造成栓剂的硬化以及甘油酯混合物液体赋形剂的沉淀。关于老化问题的实例见文献 [10]。图 22 举例说明使用 DSC 来控制液体赋形剂的分层。图 23 证明 Precirol 赋形剂的老化。低温 DSC 也可用于试制微乳^[11~13]。固体脂肪指标是指某温度时固体百分比, 对于栓剂的评价是极有价值的^[146]。它也可用于药物分析。可观察到氨茶碱的化学反应^[147]。由于大多数的脂肪酸衍生物是不饱和的, 极易氧化, 可通过 DSC 和 TG 测量氧化程度及抗氧化剂的影响, 并与降解前的情况进行比较^[148]。

5. 与水的相互作用

对于含有水的药物及辅料而言, 除了研究玻璃化转变温度外 (图 24), 相图也是选择制剂的冷冻干燥或喷雾干燥条件的基础^[149~152]。冻干技术可以很好地通过 DSC 和 TG

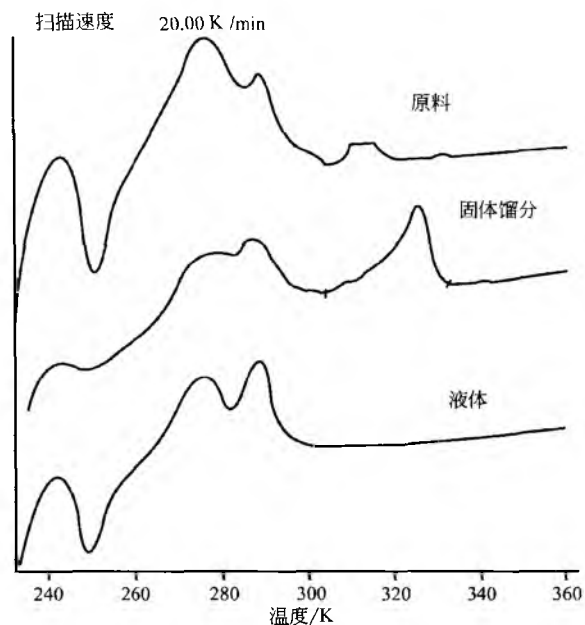
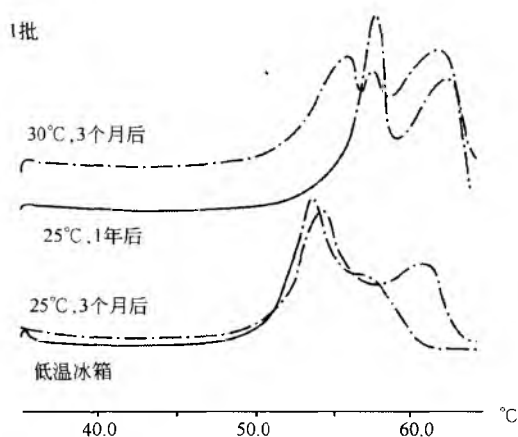


图 22 在 20K/min 的扫描速率下, 液体赋形剂分馏跟踪的 DSC 曲线



在 20°C 和 30°C, 1 批样品一年后与 2 批样品所显示的两年的 DSC 曲线相同

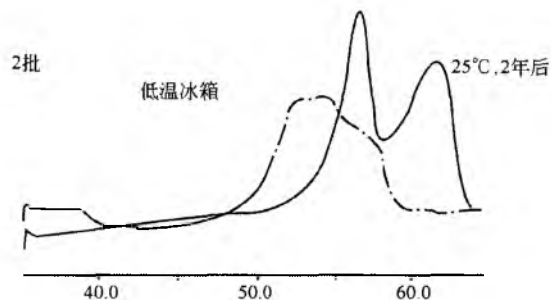


图 23 Precirol 的老化

来表征。所有成分的多晶型行为能够通过热分析技术研究。对于蛋白质, 最好在制剂中有赋形剂, 使其仍以无定形形式存在。海藻糖是一种非常有效的溶解保护剂^[153]。

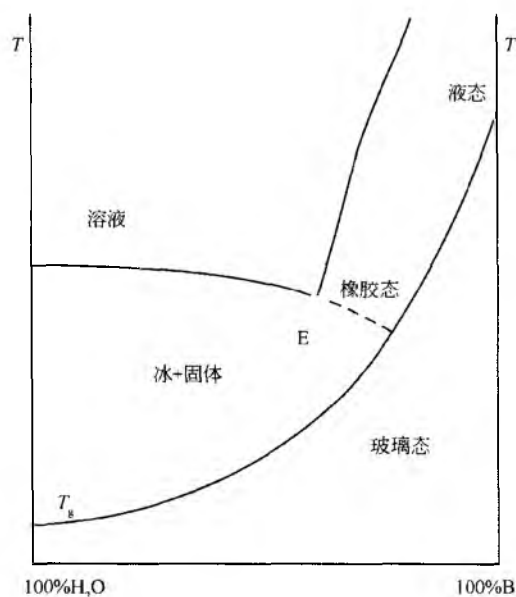


图 24 在冻干过程中, 水和无定形物质的相图

冰冻水的测量可通过测量冰的熔融峰来实现。该技术现在应用于乳剂和凝胶体中^[154,155]。图 25 为冰冻水的熔融峰。文献 [156, 157] 研究了溶出分散过程中改进的释放介质的膨胀性及其相互作用。

文献 [158] 论述了甘油-酸酯-水体系的特征。测量出典型的三种晶相 (薄片状、立方体和六边形), 并利用 DSC 研究了水-油体系及其在相转变时的老化^[159,160]。另外也可以利用热重分析法^[161]。

脂质体是包含磷脂双分子层的多层囊, 在水相中层间分散。在水介质中, 磷脂经历了凝胶体、液晶转变, 通过 DSC 可以方便地检验出这些转变。研究这些转变的温度、峰宽、能量, 可描述含水磷脂分子层的特性以及研究药物脂质体的形成^[162~164]。有人建议采用 DSC 技术研究磷脂膜药物的靶向问题^[165]。

结论

热分析技术在制药各个领域得到广泛应用。对单个化合物的表征, 它们具有唯一性。和热力学相图有关的信息对于合理的处方前研究和开发新的给药系统很有帮助。由于非常快速且仅需要极少量原材料的样品, 该项技术既可用于产品开发又可用于产品质量控制。与分光镜联用, 并结合晶体数据将更利于对复合物的相变特性的研究。

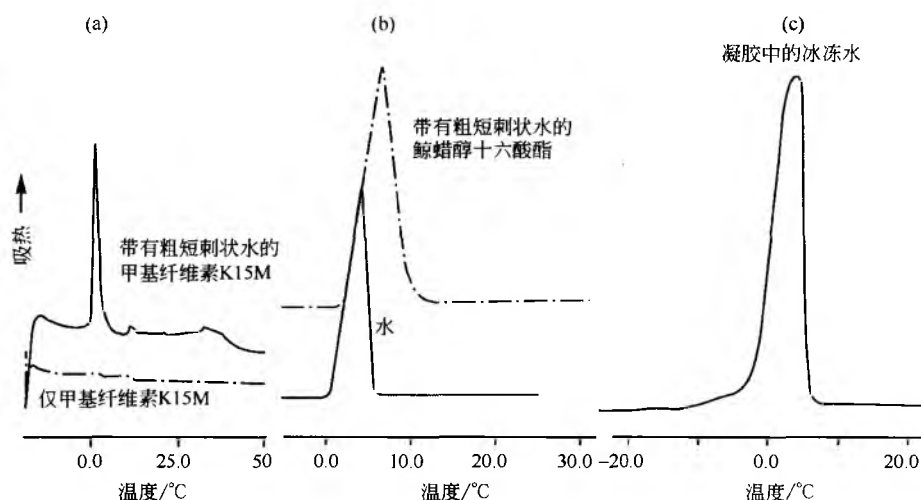


图 25 通过冰的熔融峰测量冰冻水: (a) 甲基纤维素 K15M; (b) 鲸蜡醇十六酸酯; (c) 药用凝胶

参考文献

- Wendlandt, W. W. Thermal Analysis. Chemical Analysis; 3rd Ed., Elving, P. J., Winefordner, J. D., Kolthoff, I. M., Eds.; John Wiley: New York, 1986; 19.
- Haines, P. J. Thermal Methods of Analysis, Principles, Applications and Problems; Blackie, Academic Professional; London, 1995.
- Wunderlich, B. Thermal Analysis; Academic Press: New York, 1990.
- Turi, E. A. Thermal Characterization on Polymeric Materials; 2nd Ed.; Academic Press: New York, 1997.
- Ford, J. L.; Timmins, P. Pharmaceutical Thermal Analysis Techniques and Applications. Series in Pharmaceutical Technology, Ellis Horwood Books in Biological Sciences; Rubinstein, M. H. Ed.; John Wiley & Sons: New York, 1989.
- Giron-Forest, D. Thermoanalytische Verfahren. Pharmazeutischer Qualitätskontrolle; Feltkamp, H., Fuchs, P., Sucker, H., Eds.; Stuttgart, Leipzig Germany, 1983; 298—310, Georg Thieme Verlag.
- Barnes, P. A. Applications of New Methods and Instrumentation in Thermal Analysis. Thermochim. Acta 1987, 114, 1—8.
- Brennan, W. P. Some Applications of Thermal Analysis as a Supplement to or Replacement for ASTM Testing Standards. Thermochim. Acta 1977, 18, 10—13, and 101—111.
- Giron, D. Applications of Thermal Analysis in the Pharmaceutical Industry. J. Pharm. Biochem. Anal. 1986, 40, 755—770.
- Giron, D. Thermal Analysis in Pharmaceutical Routine Analysis. Acta Pharm. Jugosl. 1990, 40, 95—157.
- Giron, D. Thermal Analysis of Drugs and Drug Products. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1995; 15, 1—79.
- Giron, D. Thermal Analysis, Microcalorimetry and Combined Techniques for the Study of Pharmaceuticals. J. Therm. Anal. Calorim. 1999, 56, 1285—1304.
- Giron, D. Contribution of Thermal Methods and Related Techniques for Rational Development of Pharmaceuticals. P. S. S. T. 1998, 1, 191—262.
- Cheng, S. Z. D.; Li, C. Y.; Calhoun, B. H.; Zhu, L.; Zhou, W. W. Thermal Analysis: The Next Two Decades. Thermochim. Acta 2000, 355, 59—68.
- Thompson, K. C. Pharmaceutical Applications of Calorimetric Measurements in the New Millennium. Thermochim. Acta 2000, 366, 83—87.
- Sarge, S. M.; Gmelin, E. Temperature, Heat and Heat Flow Rate Calibration of Differential Scanning Calorimeters. Thermochim. Acta 2000, 347, 9—13.
- Sarge, S. M.; Hohne, G. W. H.; Cammenga, H. K.; Eysel, W.; Gmelin, E. Temperature, Heat and Heat Flow Rate Calibration of Scanning Calorimeters in the Cooling Mode. Thermochim. Acta 2000, 361, 1—20.
- Sabbah, R.; Xu-wu, A.; Chickos, J. S.; Leita, M. L.; Roux, M. V.; Torres, L. A. Reference Materials for Calorimetry and Differential Thermal Analysis. Thermochim. Acta 1999, 331, 93—204.
- Giron, D.; Goldbronn, C.; Piechon, P. Thermal Analysis Methods for Pharmacopea Materials. J. Pharm. Biochem. Anal. 1989, 7, 1421—1430.
- Giron, D. Characterization of Pharmaceuticals by Ther-

- mal Analysis. *Am. Pharm. Rev.* 2000, 3 (2), 53—61, 3 (3), 43—53.
21. Han, J.; Gupta, S.; Suryanarayanan, R. Applications of Pressure Differential Scanning Calorimetry in the Study of Pharmaceutical Hydrates. II. Ampicillin Trihydrate. *Int. J. Pharm.* 1998, 170, 63—72.
 22. Gill, P. S.; Sauerbrunn, S. R.; Reading, M. Modulated Differential Scanning Calorimetry. *J. Thermal. Anal.* 1993, 40, 931—939.
 23. Hohne, G. W. H. Modulated DSC. *Thermochimica Acta* 1999, 330, 45—51.
 24. Coleman, N. J.; Craig, D. Q. M. Modulated DSC: A Novel Approach to Pharmaceutical Thermal Analysis. *Int. J. Pharm.* 1996, 135, 13—29.
 25. McPhillips, H.; Craig, D. Q. M.; Royall, P. G.; Hill, V. L. Characterization of the Glass Transition of HPC Using Modulated DSC. *Int. J. Pharm.* 1999, 180, 83—90.
 26. Craig, D. Q. M.; Barsnes, M.; Royall, P. G.; Kett, V. L. An Evaluation of the Use of Modulated Temperature DSC as a Means of Assessing the Relaxation Behavior of Amorphous Lactose. *Pharm. Res.* 2000, 17 (6), 696—700.
 27. Bottom, R. The Role of MTDSC in the Characterisation of a Drug Molecule Exhibiting Polymorphic and Glass Forming Tendencies. *Int. J. Pharm.* 1999, 192 (1), 47—53.
 28. Parkes, G. M. B.; Barnes, P. A.; Bond, G.; Charsley, E. L. Qualitative and Quantitative Aspects of Microwave Thermal Analysis. *Thermochim. Acta* 2000, 356, 85—96.
 29. Olson, E. A.; Efremov, M. Y.; Kwan, A. T.; Lai, S.; Petrova, V. Scanning Calorimeter for Nanoliter-Scale Liquid Samples. *Appl. Phys. Lett.* 2000, 77 (17), 2671—2673.
 30. Buckton, G. Application of Isothermal Microcalorimetry in the Pharmaceutical Sciences. *Thermochim. Acta* 1995, 248, 117—129.
 31. Wadsö, I. Isothermal Calorimetry. *Thermochim. Acta* 1999, 294, 1—11.
 32. Charsley, E. L.; Warne, S. St.; Warrington, S. B. Thermo-gravimetric Apparatus Temperature Calibration Using Melting Point Standards. *Thermochim. Acta* 1987, 114, 53—61.
 33. McGhie, A. R.; Chiu, J.; Fair, P. G.; Blaine, R. L. Studies on ICTA Reference Materials Using Simultaneous TG-DTA. *Thermochim. Acta* 1983, 67, 241—250.
 34. Komatsu, H.; Yoshii, K.; Okada, S.; *Chem. Pharm. Bull.* 1994, 42, 1631—1635.
 35. Giron, D. Goldbronn, C., Pfeffer, S. Automation in Thermogravimetry: Application in Pharmaceutical Industry Poster Presented at the 4th Symposium on Pharmacy and Thermal Analysis. Karlsruhe, 1999.
 36. Dunn, J. G.; Sharp, J. H. *Treatise on Analytical Chemistry*, Kolthoff, I. M. Ed.; 2nd Ed.; Part 1 John Wiley & Sons: New York, 1993; 13, 127—267.
 37. Shlieout, G.; Zessin, G. Investigation of the Internal Stress of Ethylcellulose Tablets by TMA. *Pharmazie* 1997, 52, 713—717.
 38. Ozawa, T. Kinetic Analysis by Repeated Temperature Scanning. Part 1. Theory and Methods. *Thermochim. Acta* 2000, 356, 173—180.
 39. Nakamura, K.; Kinoshita, E.; Hatakeyama, T.; Hatakeyama, H. TMA Measurement of Swelling Behavior of Polysaccharide Hydrogels. *Thermochim. Acta* 2000, 352, 171—176.
 40. Knop, K.; Matthee, K. Quellungsmessungen Von dünnen Polymerfilmen Mittels TMA. User Com (Mettler Toledo Application) 1998, 2, 9—10.
 41. Syler, R.; ASTM Spec. Techn. Publ. 1991, 1136, 22—31, Matsumari N., ASTM Spec. Techn. Publ., 1991, 1136, 32—48.
 42. Craig, D. M. Q.; Johnson, F. A. DMA for Pharmaceuticals. *Thermochim. Acta* 1995, 248, 97—115.
 43. Kühnert-Brandstätter, M. Thermomicroscopy in the Analysis of Pharmaceuticals Intern. Ser. Monog. Anal. Chem., Belcher, R., Freiser, M. Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1971; 45.
 - 43a. Kühnert-Brandstätter, M. Thermomicroscopy of Organic Compounds in Comprehensive Analytical Chemistry; Svehla, G., Ed.; Elsevier Publisher: Amsterdam, 1982; XVI, 329—428.
 44. Cooke, P. M. Chemical Microscopy. *Anal. Chem.* 1996, 68, 333R—378R.
 45. Vitez, I. M.; Newman, A. W.; Davidovich, M.; Kiersnowski, C. The Evolution of Hot Stage Microscopy to Aid Solidstate Characterizations of Pharmaceutical Solids. *Thermochim. Acta* 1998, 324, 187—196.
 46. Kellner, R.; Kühnert-Brandstätter, M. H.; Malissa, H. FTIR-Microscopic Investigations of Microphases and Microphase-Transitions in Organic Substances. *Mikrochim. Acta* 1998, 2, 133—137.
 47. Moss, R. La Spectroscopie Raman à Transformée De Fourier Dans Un Laboratoire d'analyse Industrielle. *Analisis Magazine* 1994, 22, M17—M22.
 48. Szelagiewicz, M.; Marcolli, C.; Cianferani, S.; Hard, A. P.; Vit, A.; Burkhard, A.; von Raumer, M. Ch.; Hofmeier, Ch. A.; Zilian, A. E.; Francotte, E.; Schenker, R. In Situ Characterization of Polymorphic

- Forms. The Potential of Raman Techniques. *J. Therm. Anal.* 1999, 57, 23—43.
49. Griesser, U. J.; Auer, M. E.; Burger, A. Micro-Thermal Analysis, FTIR-and Raman-Microscopy of (R, S)-Proxyphylline Crystal Forms. *Microchem. J.* 2000, 65 (3), 283—292.
50. Craig, D. Q. M.; Royall, P. G.; Reading, M.; Price, D. M.; Lever, T. J.; Furry, J. Micro-Thermal Analysis for the Characterization of Pharmaceutical Materials. *Proc. Conf. North Am. Thermal Anal. Soc.*; 26th Omnipress: Madison Wisconsin, 1998; 610—615.
51. Epple, E.; Cammenga, H. K. Temperature Resolved X-ray Diffractometry as a Thermoanalytical Method: A Powerful Tool for Determining Solid State Reaction Kinetics. *J. Therm. Anal.* 1992, 38, 619—626.
52. Conflant, P.; Guyot-Hermann, A. M. Contribution of X-ray Powder Diffraction Versus Temperature to the Solid State Study of Pharmaceutical Raw Materials. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1994, 40, 388—392.
53. Giron, D.; Draghi, M.; Goldbronn, C.; Pfeffer, S.; Piechon, P. Study of the Polymorphic Behaviour of Some Local Anesthetic Drugs. *J. Therm. Anal.* 1997, 49, 913—927.
54. Giron, D. Investigation of Polymorphism and Pseudo-Polymorphism in Pharmaceuticals by Combined Thermoanalytical Techniques. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2000, IC-TAC, in press.
55. Cavatur, R. K.; Suryanarayanan, R. Characterization of Phase Transformations during Freeze-drying by In Situ X-Ray Powder Diffractometry. *Pharm. Dev. Technol.* 1998, 3, 579—586.
56. Ashizawa, K.; Netsu Sokutei 1998, 25, 97—104.
57. Arai, T.; Kishi, A.; Kobayashi, Y. Coupled DSC and X-Ray Diffraction Instrument. *Thermochim. Acta* 1999, 325, 151—156, Rigaku Application Note Presented at the 48th Annual Denver X-ray Conference, 1999.
58. Caira, M. R. Crystalline Polymorphism of Organic Compounds. *Top. Curr. Chem.* 1998, 198, 163—208.
59. Materazzi, F. Application of Coupled TG-IR. To the Polymorphism of Pharmaceuticals. *Appl. Spectrosc. Rev.* 1997, 32, 385.
60. Ozawa, T. Application of TG-MS. *Mass Spectrom. Soc.* 1998, 11, 52.
61. Breen, C.; Last, P. M.; Taylor, S.; Komadel, P. Synergic Chemical Analysis—The Coupling of TG with FTIR, MS and GC-MS. *Thermochimica Acta* 2000, 363, 93—104.
62. Decision Tree: Investigating the Need to Set Acceptance Criteria for Polymorphism in Drug Substances and Drug Products International Conference on Harmonization (ICH) Guideline Specification Q6A, 1999.
63. Haleblan, J.; McCrone, W. J. Pharmaceutical Applications of Polymorphism. *Pharm. Sci.* 1969, 58, 911—929.
64. Haleblan, J. K. Characterization of Habits and Crystal-line Modifications of Solids and Their Pharmaceutical Applications. *Pharm. Sci.* 1975, 64, 1269—1288.
65. Giron, D. Le Polymorphisme. *Labo-Pharma-Probl. Techn.* 1981, 307, 151—160.
66. Masse, J.; Bauer, M.; Billot, P.; Broquaire, M.; Chauvet, A.; Doveze, J.; Garinot, O.; Giron, D. Etude Du Polymorphisme Et Du Pseudopolymorphisme à L'aide Des Méthodes Thermo-Analytiques, Rapport d'une Commission SFSTP. *S. T. P. Pharma Prat.* 1997, 7, 235—246.
67. Giron, D. Thermal Analysis and Calorimetric Methods in the Characterization of Polymorphs and Solvates. *Thermochim. Acta* 1995, 248, 1—59.
68. Giron, D. Le Polymorphisme Des Excipients. *STP Pharma (Hors serie)* 1990, 6, 87—98.
69. Burger, A.; Ramberger, R. On the Polymorphism of Pharmaceuticals and Other Molecular Crystals. I. Theory of Thermodynamic Rules. *Mikrochim. Acta* 1979, 2, 259—271.
70. Burger, A.; Ramberger, R. On the Polymorphism of Pharmaceuticals and Other Molecular Crystals. II. Applicability of Thermodynamic Rules. *Mikrochim. Acta* 1979, 2, 273—316.
71. Burger, A. Thermodynamic and Other Aspects of the Polymorphism of Drugs. *Pharm. Int.* 1982, 3, 158—163.
72. Burger, A.; Henck, J. O. The Presentation of Polymorphic Systems by Energy/Temperature Diagrams. *Biopharm. Pharm. Technol.* 1995, 1, 10—11.
73. Toscani, S. An Up-To-Date Approach to Drug Polymorphism. *Thermochim. Acta* 1998, 321, 73—79.
74. Jacques, J.; Collet, A.; Wilen, S. H. Enantiomers, Racemates and Resolutions; John Wiley, 1981.
75. Bernstein, J.; Davey, R. J.; Henck, J. O. Concomitant Polymorphs. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 3340—3461.
76. Coquerel, G. Review on the Heterogeneous Equilibria Between Condensed Phases in Binary Systems of Enantiomers. *Enantiomer* 2000, 5, 481—498.
77. McCauley, J. A. Detection and Characterization of Polymorphism in the Pharmaceutical Industry. *AIChE Symp. Ser.* 1991, 87, 58—63.
78. Giron, D.; Piechon, P.; Goldbronn, C.; Pfeffer, S. Thermal Analysis, Microcalorimetry and Combined Techniques for the Study of the Polymorphic Behavior of a Purine Derivative. *J. Therm. Anal. Calorim.* 1999, 57, 61—72.

79. Hancock, B. C.; Zografi, G. The Relationship Between the Glass Transition Temperature and the Water Content of Amorphous Solids. *Pharm. Res.* 1994, 11, 471–417.
80. Hancock, B. C.; Zografi, G. Characteristics and Significance of the Amorphous State in Pharmaceutical Systems. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86, 1–12.
81. Shalaev, E. Y.; Zografi, G. How Does Residual Water Affect the Solid State Degradation of Drugs in the Amorphous State. *J. Pharm. Sci.* 1996, 85, 1137–1141.
82. Hancock, B.; Dalton, C. R.; Pikal, M. J.; Shamblin, S. L. A Pragmatic Test of a Simple Calorimetric Method for Determining the Fragility of Some Amorphous Pharmaceutical Materials. *Pharm. Res.* 1998, 15, 762–767.
83. Andronis, V.; Zografi, G. Crystal Nucleation and Growth of Indomethacin Polymorphs from the Amorphous State. *J. Non-Cryst. Solids* 2000, 271, 236–248.
84. Kontny, M. J.; Zografi, G. Sorption of Water by Solids. *Drugs Pharm. Sci.* 1995, 70, 387–418.
85. Di Martino, P.; Piva, F.; Conflant, P.; Guyot-Hermann, A. M. Thermal Analysis and Powder X-Ray Diffraction Study of Terpin. Evidence of a Eutectic (Hydrate/Anhydrous Form). *J. Thermal Anal. Calorim.* 1999, 57, 95–111.
86. Soustelle, M. Physico-Chemical Transformation of Powders. *Powder Technology and Pharmaceutical Processes*; Chulia, D., Deleuil, M., Pourcelot, Y. Eds.; Elsevier Science; Amsterdam, 1994; 27–58.
87. Morris, K. R. Structural Aspects of Hydrates and Solvates. *Drugs Pharm. Sci.* 1999, 95, 125–181, Polymorphism in Pharmaceutical Solids; Brittain, H. G., Ed.; Marcel Dekker, Inc.; New York.
88. Kankhari, R. K.; Grant, D. J. W. Pharmaceutical Hydrates. *Thermochim. Acta* 1995, 248, 61–79.
89. McCauley, J. A.; Varsolona, R. J.; Levorse, D. A. The Effect of Polymorphism and Metastability on the Characterization and Isolation of Two Pharmaceutical Compounds. *J. Phys. D, Appl. Phys.* 1993, 26, B85–B89.
90. Giron, D.; Goldbronn, C. Use of Sub-Ambient DSC to Complement Conventional DSC And TG. *J. of Thermal Anal.* 1997, 49, 907–912, 1998; 51, 727.
91. Byström, K. Thermometric Company. Application Note 22004 1990.
92. Humera, A.; Buckton, G.; Rawlins, D. A. The Use of Isothermal Microcalorimetry in the Study of Small Degrees of Amorphous Content of Hydrophobic Powder. *Int. J. Pharm.* 1996, 130, 195–201.
93. Giron, D.; Remy, P.; Thomas, S.; Vilette, E. Quantitation of Amorphicity by Microcalorimetry. *J. Thermal Anal.* 1997, 48, 465–472.
94. Giron, D.; Goldbronn, C. Place of DSC Purity Analysis in Pharmaceutical Development. *J. Thermal. Anal.* 1995, 44, 217–251.
95. Neah, S. H.; Shinwari, M. K.; Hellmuth, E. W. Melting Point Phase Diagrams of Free Base and Hydrochloride Salts of Bevantolol, Pindolol and Propanolol. *Int. J. Pharm.* 1993, 99, 303–310.
96. Elsabee, M.; Frankerd, R. J. Solid State Properties of Drugs. DSC Of Chiral Drugs Mixtures Existing as Racemic Solid Solutions, Mixtures or Racemic Compounds. *Int. J. Pharm.* 1992, 86, 221–230.
97. Grunenberg, A.; Kell, B.; Henck, J. O. Polymorphism in Binary Mixtures, as Exemplified by Nimodipine. *Int. J. Pharm.* 1995, 118, 11–21.
98. Li, Z.; Zell, M. T.; Munson, E. J.; Grant, D. J. W. Characterization of Racemic Species of Chiral Drugs Using Thermal Analysis, Thermodynamic Calculation and Structural Studies. *J. Pharm. Sci.* 1999, 88, 337–346.
99. Rustichelli, C.; Gamberini, M. C.; Ferioli, V.; Gamberini, G. Properties of the Racemic Species of Verapamil Hydrochloride and Gallopamil Hydrochloride. *Int. J. Pharm.* 1999, 178, 111–120.
100. Pitre, D.; Nebuloni, M.; Ferri, V. Calorimetric Determination of the Enantiomeric Purity of (1R, 2R)-2-Amino-1- (4-nitrophenol)-1, 3-Propanediol. *Arch. Phar. (Weinheim)* 1991, 324, 325–328.
101. Pitre, D.; Nebuloni, M. Further Characterization of the Solid Form of Iopanoic Acid and Its Enantiomers. *Arch. Phar. (Weinheim)* 1992, 325, 385–388.
102. Madarasz, J.; Kozma, D.; Pokol, G.; Acs, M.; Fogassay, E. Merit of Estimation from DSC Measurements for the Efficiency of Optical Resolutions. *J. Thermal Anal.* 1994, 42, 877–894.
103. Tonitou, E.; Chow, D. D.; Lawter, J. R. Chiral Beta-blockers for Transdermal Delivery. *Int. J. Pharm.* 1994, 104, 19–28.
104. Romero, A. J.; Rodhes, C. T. Approaches to Stereospecific Preformulation of Ibuprofen. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1992, 17, 777–792.
105. Dwivedi, S. K.; Sattari, S.; Jamaki, F.; Mitchell, A. G. Ibuprofen Racemate and Enantiomers. Phase Diagrams, Solubility and Thermodynamic Studies. *Int. J. Pharm.* 1992, 87, 95–104.
106. Li, Z.; Grant, D. J. W. Relationship between Physical Properties and Crystal Structure of Chiral Drugs. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86, 1073–1078.
107. Doelker, E. Physicochemical Behavior of Active Substances. Consequences for the Feasibility and Stability of Pharmaceutical Forms. *S. T. P. Pharma Prat.* 1999, 9,

- 399—409.
108. Buckton, G.; Darcy, P. Water Mobility in Amorphous Lactose Below and Close to the Glass Transition Temperature. *Int. J. Pharm.* 1996, 136, 141—146.
109. Figura, L. O. The Physical Modification of Lactose and Its Thermoanalytical Identification. *Thermochim. Acta* 1993, 222, 187—194.
110. Wada, Y.; Matsubayara, H. Magnesium Stearate. *Thermochim. Acta* 1992, 196, 63—84.
111. Containers<661>Physico-Chemical Tests Plastics. USP 24; 2000, 1933—1935.
112. Schneider, H. A.; Di Marzio, E. A. The Glass Transition of Polymer Blends. *Polymer* 1992, 33, 3453—3460.
113. Corrigan, O. I. Retardation of Polymeric Carrier Dissolution by Dispersed Drugs. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 1986, 12, 1777—1791.
114. Craig, D. Q. M.; Newton, J. M. Characterization of Polyethylene Glycols using Differential Scanning Calorimetry. *Int. J. Pharm.* 1991, 74, 33—41.
115. Craig, D. Q. M. A Review of Thermal Methods Used for the Analysis of the Crystal Form, Solution Thermodynamics and Glass Transition Behavior of Polyethylene Glycols. *Thermochim. Acta* 1995, 248, 189—203.
116. Sunol, J. J.; Farjas, J.; Berlanga, R.; Saurina, J. Thermal Analysis of a Polyethylene Glycol (PEG 4000): T-CR-T Diagram Construction. *J. Thermal Anal. Calorim.* 2000, 61, 711—718.
117. Ford, J. L. The Use of Thermal Analysis in the Study of Solid Dispersions. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1987, 13, 1741—1777.
118. Barabas, E. S.; Adeyeye, C. M. Povidone. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*; Brittain, H. G., Ed.; Academic Press: New York, 1993; 22, 555—685.
119. Tan, Y.; Challa, G.; *Polymer* 1976, 17, 739—750.
120. Sakellariou, P.; Rowe, R. C.; White, E. F. T. The Thermomechanical Properties and Glass Transition Temperatures of Some Cellulose Derivatives. *Int. J. Pharm.* 1985, 27, 267—277.
121. Ford, J. L. Thermal Analysis of Hydroxypropylmethylcellulose and Methylcellulose: Powders, Gels and Matrix Tablets. *Int. J. Pharm.* 1999, 179, 209—220.
122. Kaloustian, J.; Pauli, A. M.; Pastor, J. Thermal Analysis of Cellulose and Some Etherified and Esterified Derivatives. *J. Thermal. Anal.* 1997, 48, 791—804.
123. Sanghavi, N. M.; Sheikl, F.; Fruitwala, M.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1994, 20, 1923—1931.
124. Sakellariou, P.; Rowe, R. C.; White, E. T. F. The Solubility Parameters of Some Cellulose Derivatives and Poly-ethylene Glycols Used in Tablet Film Coating. *Int. J. Pharm.* 1986, 31, 175—177.
125. Wu, C.; McGinity, J. W. Non Traditional Plasticization of Polymeric Films. *Int. J. Pharm.* 1999, 177, 15—27.
126. Amighi, K.; Moes, A. J. Determination of Thermal Properties and Film Formation Characteristics of Different Acrylic Aqueous Dispersions Used for Film Coating. *Pharm., Biopharm. Pharm. Technol.* 1995, 1, 52—53.
127. Appelqvist, I. A. M.; Cooke, D. Thermal Properties of Polysaccharides at Low Moisture: An Endothermic Melting Process and Water-Carbohydrate Interactions. *Carbohydr. Polym.* 1993, 20.
128. Cesaro, A. Thermodynamics of Phase Equilibria in Biotechnological Polysaccharides. *Indian. J. Technol.* 1992, 30, 565—577.
129. Corrigan, O. I. Thermal Analysis of Spray Dried Products. *Thermochim. Acta* 1995, 248, 245—258.
130. Pitt, G. G.; Gu, Z. W. Modification of the Rates of Chain Cleavage of Poly (ϵ -caprolactone) and Related Polyesters in the Solid State. *J. Controlled Release* 1987, 283 (4), 283—291.
131. Aktar, S.; Ponton, C. W.; Notariami, L. J.; Gould, P. L.; *Pharm. Res.* 1989, 5, 556—560.
132. Dubernet, C. Thermal Analysis of Microspheres. *Thermochimica Acta* 1995, 248, 259—269.
133. Rosilio, V. Study of Progesterone Loaded Poly (D, L -Lactide-co-Glycolide). *Pharm Res.* 1998, 13, 794—800.
134. Giordano, F.; Bettinetti, G. P. An Experimental and Theoretical Approach to the Analysis of Binary Systems. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1988, 6, 951—955.
135. Crowley, K. J.; Forbes, R. T.; York, P.; Nyqvist, H.; Camber, O. Oleate Salt Formation and Mesomorphic Behavior in the Propanolo/Oleic Acid Binary System. *J. Pharm. Sci.* 1999, 88, 586—591.
136. Koenigbauer, M. J. Pharmaceutical Applications of Microcalorimetry. *Pharm. Res.* 1994, 11, 777—783.
137. Serajuddin, A. T. M. Solid Dispersion of Poorly Water-Soluble Drugs: Early Promises, Subsequent Problems and Recent Breakthroughs. *J. Pharm. Sci.* 1999, 88, 1058—1066.
138. Keipert, S.; Voigt, R. Interactions between Macromolecules Excipients and Drugs. Improvement of Dissolution of Benzodiazepines Derivatives by PVP. *Pharmazie* 1986, 41, 400—404.
139. Duchêne, D. New Trends in Cyclodextrins and Their Derivatives; *SantéParis*, 1991.

140. Giodarno, F.; Bruni, G.; Bettinetti, G. P. Solid State Microcalorimetry on Drug Cyclodextrin Binary Systems. *J. Thermal. Anal.* 1992, 38, 2683—2690.
141. Chun, I. K.; Yun, D. S.; *Int. J. Pharm.* 1993, 96, 916103.
142. Funk, O.; Schwab, L.; Frömming, K. H.; J. Inclusion Phenom. *Mol. Recognit. Chem.* 1993, 16, 299—314.
143. Giron, D.; Goldbronn, C. Use of DSC and TG For Identification and Quantification of the Dosage Form. *J. Thermal. Anal.* 1997, 48, 473—483.
144. Bucci, R.; Magri, A. D.; Magri, A. L. DSC in the Chemical Analysis of Drugs. Determination of Diclofenac in Pharmaceutical Formulations. *J. Therm; Anal. Calorim.* 2000, 61 (2), 369—376.
145. Garti, N. Crystallization and Polymorphism of Fats and Fatty Acids; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1988.
146. Giron, D.; Riva, A.; Steiger, M. DSC as Support for the Development of Suppositories. *Thermochim. Acta* 1985, 85, 509—512.
147. Prya-Jones, R. H. Aminophylline Suppository Decomposition: An Investigation Using DSC. *Int. J. Pharm.* 1992, 86, 231—237.
148. Riga, A.; Patterson, G. H. Oxidative Behavior of Materials by Thermal Analytical Techniques; ASTM Special Technical Publication 1326, 1997, ASTM.
149. Franks, F. Freeze-Drying: From Empiricism to Predictability. The Significance of Glass Transition. *Dev. Biol. Stand.* 1992, 74, 9—19.
150. Franks, F. The Glassy State in Foods. *Int. J. Food Sci. Technol.* Blanshard, J. M. V., Lillford, P. J., Eds.; 1995; 30, 89—100.
151. Liapiz, A. I.; Pikal, M. J.; Bruttini, R. Research and Development Needs and Opportunities in Freeze-Drying. *Drying Technol.* 1996, 14, 1265—1300.
152. Ross, H.; Franks, F. Stabilization of Pharmaceutical Drug Substances by Freeze-Drying: A Case Study. *Drug Stab.* 1996, 1, 73—85.
153. Mehl, P. M. Solubility and Phase Transitions in the System Trehalose/Water. *J. Thermal Anal.* 1997, 49, 817—821.
154. Junginger, H. E. Polyhydroxy Methacrylate-co-methacrylic Acid: Effect of Water, PEG 400 and PEG 6000 on the Glass Transition Temperature. *Polymer* 1989, 30, 1946—1953.
155. Kodama, M.; Kato, H.; Aoki, H. Water Molecules in Subgel Phase of Dimyristoylphosphatidylethanolamine/Water. *Thermochim. Acta* 2000, 352, 213—221.
156. Katzhendler, I.; Mader, K.; Friedman, M. Structure and Hydration Properties of Hydroxypropyl Methylcellulose Matrices Containing Naproxen and Naproxen Sodium. *Int. J. Pharm.* 2000, 200, 161—179.
157. Aoki, S.; Ando, H.; Ishii, M.; Watanabe, S.; Ozawa, H. Water Behavior During Release from a Matrix Observed Using Differential Scanning Calorimetry. *J. Controlled Release* 1995, 33, 365—374.
158. Morley, W. G.; Tiddey, G. J. Phase Behaviour of Monoglyceride-Water Systems. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1993, 89, 2823—2831.
159. Eccleston, G. M.; Beattie, L. Microstructural Changes During Storage of Systems Containing Cetostearyl Alcohol/Polyoxyethylene Alkyl Ether Surfactants. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1988, 14, 2499—2518.
160. Eccleston, G. M. Phase Transitions in Ternary Systems and Oil-Un-Water Emulsions Containing Cetrimide and Fatty Alcohols. *Int. J. Pharm.* 1985, 27, 311—32.
161. Regola, A.; Canesi, M.; Dolfini, A.; Gazzaniga, A. Use of Thermogravimetry in the Physicochemical Characterization of Hydrophilic Creams. *Boll. Chim. Farm.* 1996, 135, 67—71.
162. Blume, A. Biological Calorimetry: Membranes. *Thermochimica Acta* 1991, 193, 292—347.
163. Taylor, K. M. G.; Morris, R. M. Liposomes. *Thermochimica Acta* 1995, 248, 289—302.
164. Van Winden, E. C. A.; Zhang, W.; Crommelin, D. J. A. Effect of Freezing Rate on the Stability of Liposomes During Freeze-drying and Rehydration. *Pharm. Res.* 1997, 14, 1151—1156.
165. Puglisi, G.; Fresta, M.; Ventura, C.; Mazzone, G.; Vandelli, M. A. Methotrexate Interaction with a Lipid Membrane Model of DPPC. *J. Thermal Anal.* 1995, 44, 1287—1299.

(朱娟 陈桂良 译)

R

热熔挤出技术

Michael Repka

The University of Mississippi, University, Mississippi, U. S. A.

John J. Koleng, Jr.

Feng Zhang

Jim W. McGinity

The University of Texas at Austin, Austin, Texas, U. S. A.

引言

热熔挤出技术是塑料工业领域应用最广泛的技术之一。18 世纪末期 Joseph Brama 为了生产铅管发明了挤出工艺。一直到 19 世纪中期，热熔挤出技术才开始应用于塑料工业，它首次用于电线的绝缘聚合物涂层的生产。如今热熔挤出技术不仅广泛用于聚合物制品的生产，而且也用于聚合物本身的生产与混合中。目前包括塑料袋、塑料布及塑料管等在内的超过半数的塑料制品的生产都采用了这项工艺^[1]。

在制药领域，一些科研小组证实热熔挤出技术可用于制备颗粒、缓释片剂、透皮和透黏膜的药物转运系统。熔融的热塑性聚合物在挤出过程中可以发挥热的黏合剂的作用，而离开挤出机固化后，则可以阻止药物释放。对于薄膜加工，聚合物通过加热成形而不是传统的溶剂涂布技术。

与传统的加工技术相比，热熔挤出技术在药学方面的应用有许多优点：①该工艺不需要溶剂和水；②工艺步骤

少，可以省去费时的烘干步骤；③对主药的可压性没有要求，整个流程简单、连贯和高效；④处理过程的剧烈混合与搅拌使得混悬颗粒在熔融的聚合物中均匀分散，可以使细颗粒分布更均匀；⑤药物在热熔挤出剂型中以分子水平分散时，可以提高其生物利用度。由于多数药物对热敏感，所以在用热熔挤出工艺制备药物剂型时，必须选用在相对较低温度下就能加工的药用级聚合物，在短时间的加热过程中，所有组分都必须在该温度下保持稳定。

工艺和设备

热熔挤出设备由挤出机、下游的辅助设备和其他用于性能和产品质量评价的监控装置组成^[2]。挤出机由加料斗、圆筒、螺杆、模具、螺杆驱动单元和冷却/加热设备组成。典型的挤出机如图 1 所示。下游设备用于收集挤出物以进行后续处理。设备上的监控装置包括温度计、螺杆速度控制器、挤出力矩控制器和压力表。

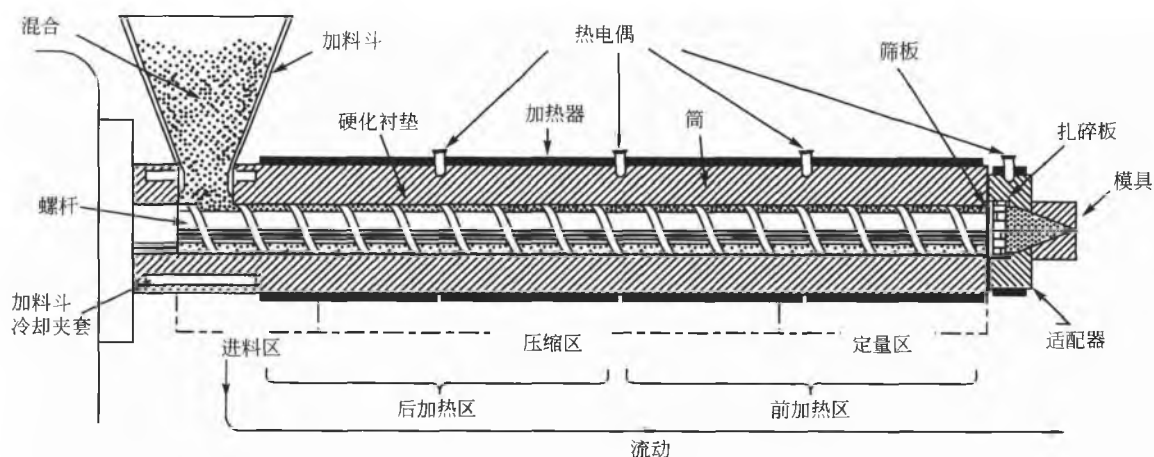


图 1 单螺杆挤出机示意图

在热熔挤出过程中，圆筒预设成不同的温度区。将热塑性聚合物与辅料的混合物通过加料斗注入挤出机的圆筒。这些混合物通过旋转的螺杆运送到已加热的桶内。桶内不同区域的温度由电加热棒带控制，而热电偶用来监控温度。筒内的混合物受热主要来自于螺杆旋转的剪切作用和加热

的圆筒传递的热量。熔融的物料最终通过附在圆筒末端的模具泵出，进入下游辅助装置做进一步处理。

持续的挤压过程要求原料在加料斗内具有良好的流动性。为了满足这个条件，加料斗外壁和水平线的夹角要大于原料的休止角。当物料具黏性或是非常细的粉末时，物

料会在加料斗的狭口处形成实体桥,使粉末流动不理想,因此有时会采用强制加料装置。

挤出螺杆的设计能显著影响热熔挤出的效率。螺杆的作用是转运在圆筒的原料,使聚合物原料进行混合、压缩、熔融,并将熔融的物料挤过模具。可以用一些参数定义螺杆的几何特征(图2)。

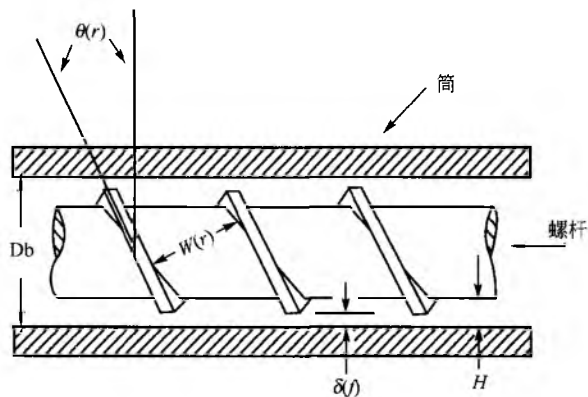


图2 挤出螺杆的结构示意图。筒的直径 (Db): 筒的内径。槽的深度 (H): 从螺杆牙底至筒内壁的距离。螺牙间隙 ($\delta(r)$): 螺牙到筒内表面的距离。槽宽 [$W(r)$]: 两道相邻螺牙的距离。螺旋角 [$\theta(r)$]: 螺牙与垂直的螺杆轴部形成的角度

大多数的螺杆由不锈钢制成,表面还有涂层,可以耐受挤出过程中产生的摩擦力和可能的表层腐蚀。如图1所示,根据螺杆各部分的几何设计和功能不同,挤出机通常可分为三个区域:进料区、熔融挤出区和定量区。热熔挤出技术早期仅使用单螺杆挤出机。19世纪30年代末期,双螺杆挤出机问世。双螺杆挤出机可以同向旋转(同向挤出机),也可以反向旋转(反向挤出机)。同单螺杆挤出机相比,双螺杆挤出机有许多优势,如加料方便、混合充分、原料不会过热、滞留时间短等。

进料区的功能是压缩原料,并将原料运送到挤出机的圆桶内。加料区槽的深度最大(图2)。加料区的性能取决于螺杆和圆筒表面的外部摩擦系数。圆筒内表面的摩擦力是原料转运的驱动力,而螺杆表面的摩擦力却限制了原料的向前运动。圆筒的摩擦系数越大,螺杆表面的摩擦系数越低,原料在加料区的运输效率越高。原料的其他性质如堆密度、颗粒大小和形状以及原料的压缩性同样影响加料区的性能。只有高效的原料传送才能维持压缩区和定量区压力的增加,而后者只有足够高才能确保挤出机高效率输出。在加料区调整圆筒的温度可以优化筒表面的摩擦力。如果加入的原料成分不均匀,就会出现波动现象,导致输出速率、头部压力和产品质量发生周期性变化。

聚合物进入挤出机的压缩区后开始熔融。熔融区的温度一般设置在无定形聚合物的玻璃转化温度以上 $30\sim 60^{\circ}\text{C}$,或高于半结晶性聚合物的熔点 $30\sim 60^{\circ}\text{C}$ 。

在一般的加工过程中,聚合物呈伪塑性流体熔融。伪塑性流体的黏度取决于剪切速度,遵循如下的幂律公式:

$$\eta = K \times \dot{\gamma}^{n-1} \quad (1)$$

式中: η 为聚合物熔融体的黏度; $\dot{\gamma}$ 为施加于熔融体上的剪切速率; K 与聚合物的性质有关,为温度的指数函数; n 为常量(聚合物熔融体的 n 值为 $0.25\sim 0.9$),仅与聚合物的性质有关。

挤出过程中,圆筒的温度需达到聚合物挤出所需的最低温度。否则由于聚合物熔融体的黏度过高,螺杆的剪切力矩会超过驱动单元能力。在切变速率一定的情况下,聚合物熔融体的黏性与温度有关,遵循 Arrhenius 公式[式(2)]

$$\eta = K' \times \eta_a^{E_a/RT} \quad (2)$$

式中: K' 为常量,与聚合物的结构与相对分子质量有关; E_a 为流动过程中聚合物的活化能,同类型聚合物的 E_a 值相同; R 为摩尔气体常量; T 为热力学温度。

圆筒产生的热量促进熔融过程。但熔融过程所需的大部分热是由剪切聚合物熔融体时的黏滞热发散提供的。黏滞热的形成是机械能转变成聚合物熔融体热能的过程。由黏滞热的发散导致的每单位体积产热速率的计算公式为

$$E = m \times \dot{\gamma}^{n+1} \quad (3)$$

式中: m 为常量; $\dot{\gamma}$ 为剪切速率; n 为幂率流体常数^[3]。

熔融过程的效率与聚合物的性质和挤出机的几何设计有关。一般而言,低黏度、高导热能力的聚合物的熔融过程更高效。改变螺杆设计有时也会改善熔融过程。如果熔融不充分,固化的塑料或聚合物组分就可能在槽内造成阻塞,这会导致挤出出现“波动”现象。

热塑性聚合物在定量区基本处于熔融状态。挤出输出率与槽的深度和螺杆定量区的长度有关。定量区有一个浅槽。与进料区相似,定量区的静止圆筒与旋转螺杆之间的相对运动会产生一个向下槽方向的速度矢量,即“牵制流”。然而由于模具中有压力,聚合物熔融体槽内向下流动的运动受到了限制。这种因压力导致聚合物熔融体输出率降低的现象叫“压力流”。牵制流和压力流之间的区别在于总流速不同^[5]。

模具安装在圆筒的末端,其几何构型决定了熔融挤出物的物理形状。熔融物离开模具时膨胀,引起挤出物横截面积增大。聚合物熔融体具有黏弹性,它能部分恢复因圆筒内螺杆挤出引起的变形,这就是所谓的“模具膨胀”。

热熔挤出的工艺条件与热聚合物的化学稳定性和物理性质有关,如相对分子质量、玻璃转化温度和熔点(若为半结晶聚合物)等。在热熔挤出过程中,聚合物受到了旋转螺杆产生的机械切应力和相对较高的加工温度引起的热应力的作用。在这些力的作用下,聚合物容易发生结构链断裂、化学解聚以及热降解,因而广泛采用差示扫描量热法、凝胶色谱法等技术监控热熔挤出过程中聚合物的稳定性。一般可在处方中加入增塑剂、抗氧化剂以及其他添加剂,以改善聚合物在挤出过程中的稳定性。

热熔挤出工艺需要不同类型的下游加工设备。制备挤出薄膜时,在薄膜收卷前,要用冷的滚筒冷却并控制薄膜温度。调整冷滚筒的转速可以控制薄膜的厚度。冷滚筒温度也会影响薄膜的性质。杆状挤出物可以通过水浴或冷空气管降温,然后用制粒装置切成颗粒状。

R

热熔挤出使用的原料

热熔挤出剂型所用的原料在纯度与安全性上必须符合传统剂型材料的标准。大多数应用于生产热熔挤出药品的化合物已经用于生产其他固体剂型,如片剂、微丸和透皮制剂等。热熔挤出产品中使用的原料不仅需要有一定的物理化学稳定性,还要具有一定的热稳定性。单个原料及其混合物要有足够的热稳定性,在生产过程中不降解。

热熔挤出制剂是主药与辅料的复杂混合物。辅料可以广义地分为骨架载体、释放调节剂、填充剂以及各种添加剂。和传统剂型相同,热熔挤出剂型中辅料的选择和使用也能影响其特性。

药剂学家在开发可接受的剂型时,筛选药物处方和制备方法往往受到主药性质的限制。热熔挤出是制药工业领域一项相对较新的技术,与传统工艺相比有许多优势。该工艺不需水,因此避免了由于使用水或含水乙醇等制剂溶媒而引起可能的药物水解。此外可压性较差的材料可以加到通过切割挤出棒而制得的片剂中,从而避免了传统压制剂型中常见的压片问题。最初的评价项目包括药品的热、化学和物理性质。处方中药品和赋形剂的性质决定了最终

剂型中药物的存在形式,如不溶性颗粒、固态溶液或复合物等。剂型中药物的状态对产品的工艺可行性和稳定性有很大的影响。

处方中的主药除了可以发生热降解外,还会干扰处方中其他化合物的作用。比如在热熔挤出条件下盐酸心得平熔融,而降低了挤出物的黏性,产生了一种难以处理的物质^[6]。Cuff 和 Raouf 报道由注模法制备相似的剂型时,非诺洛芬钙可以抑制 PEG-MCC 骨架硬化,导致药品不能使用^[7]。利多卡因可以有效降低 Eudragit® E/HDPE 膜的 T_g ^[8],氢化可的松能够时间依赖性地降低羟丙基纤维素(HPC)膜的玻璃转化温度^[9]。上述变化有的有益(如后个例子),有的有害(如前个例子)。

如前所述,药物在终产品中可能以几种形态中的一种存在。在射出成形^[7]和热熔挤出^[10]体系中对每种形态的优点和缺点分别进行了讨论。大多数情况下固体分散系统比固体溶液更稳定,也更易制备。而后者可以制成透明的体系,并能提高溶解性较差的化合物的生物利用度。图 3 和图 4 显示了含利多卡因的聚合物薄膜的 X 射线衍射图。在挤出样品中没有出现利多卡因峰,系统中聚合物 T_g 值降低,这些都说明药物存在于薄膜骨架的固体溶液中。

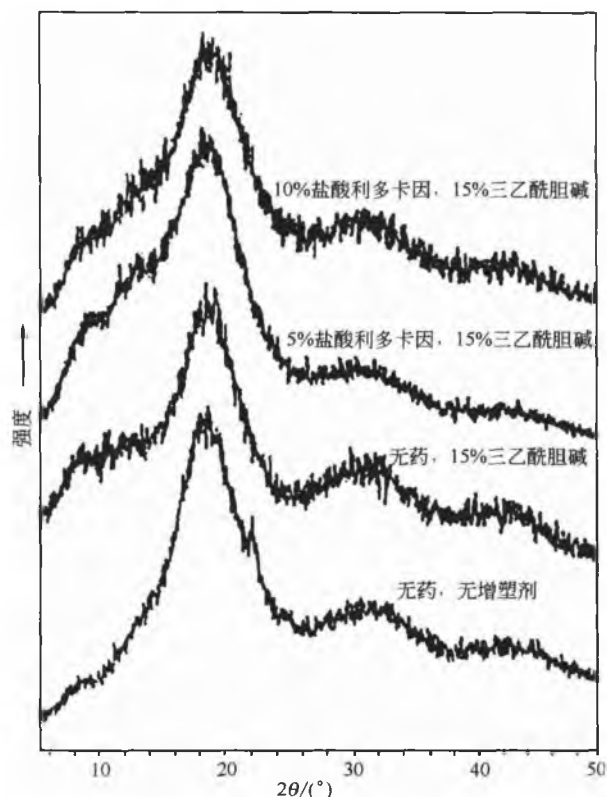


图3 Eudragit E 挤出薄膜的广角 X 射线衍射扫描图,显示增塑剂和药物对聚合物薄膜的影响^[8]

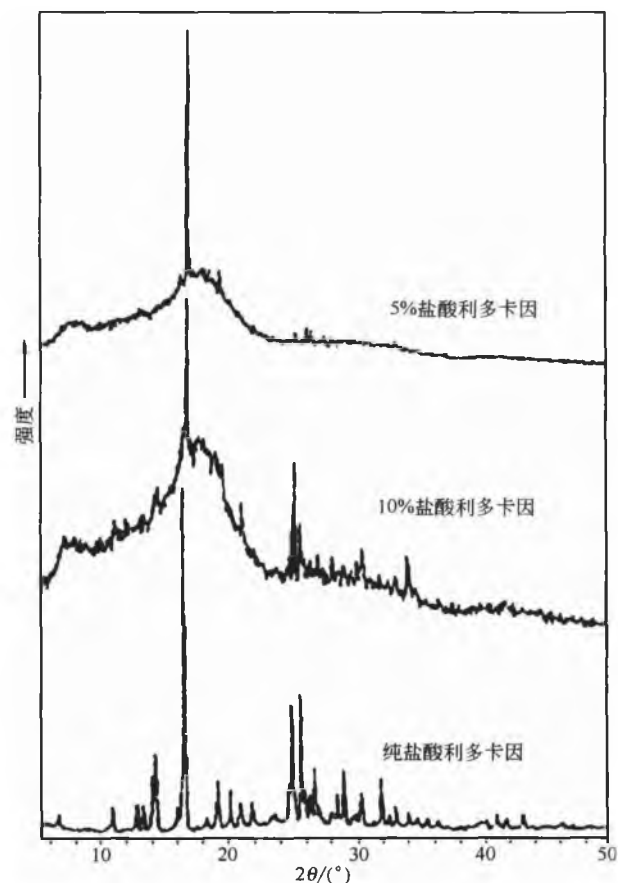


图4 Eudragit E100 与 5%、10% 盐酸利多卡因物理混合物和盐酸利多卡因晶体的广角 X 射线衍射扫描图的比较^[8]

在热熔挤出的给药系统中,主药被包埋入载体,处方中还包含了一种或多种熔融性物质和其他辅料。这些熔融性物质可能是聚合物材料^[6~12],也可能是低熔点的蜡类^[13,14]。选择合适的载体化合物对处方和热熔挤出剂型设

计非常重要。载体的性质常常决定了剂型单元的生产工艺条件,而载体的化学和物理性质则能对最终剂型中主药的释放起调节作用。表1列出了热熔挤出剂型中使用的载体化合物的部分性质。

表1 热熔挤出剂型的设计和选用载体的性质

化学名称	商品名	相对分子质量范围	熔点范围	玻璃转化温度	参考文献
聚合物载体					
乙基纤维素	Ethocel® Aqualon® EC	根据黏度, n 为 7~100	大于 190°C 分解	130~133°C	[6, 41]
羟丙纤维素	Klucel®	80 000~1 150 000	焦化温度是 260~275°C	软化温度 130°C	[9, 42]
聚乙二醇	Carbowax®	1000~20 000	37~63°C	MW 6000 的温度是 -17°C	[7, 15, 43]
聚氧化乙烯	Polyox® WSR	100 000~7 000 000	65~80°C	-60 到 -40°C	[4, 44]
聚甲基丙烯酸酯	Eudragit® RSPM Eudragit® E	>100 000	—	40~52°C	[6, 8, 44]
非聚合物载体					
Carnauba Wax		81~86°C	78~95		[13, 14, 45]

使用聚合物载体时,在处方中加入增塑剂可以改善生产挤出剂型的工艺条件,也可以改善终产品的物理机械性质。选择增塑剂要权衡多方面的因素,如增塑剂和聚合物的相容性以及增塑剂的稳定性等。人们对甘油醋酸酯^[6]、枸橼酸酯^[8,9]以及低相对分子质量的聚乙二醇^[6,9,12]等在热熔挤出系统中的增塑作用进行了研究。如前所述,某些药物可以用作不同热熔挤出系统中的增塑剂^[6,8,9]。增塑剂可以降低聚合物的玻璃转化温度(T_g)和生产过程中的加工温度。聚合物 T_g 的降低与增塑剂的种类和用量有关。图5显示了多种增塑剂在降低羟丙纤维素膜 T_g 方面的效能。

降低加工温度可提高主药^[9]和聚合物载体的稳定性^[6,12]。增塑剂还可以降低挤出聚合物所需的剪切力,从而改善某些高相对分子质量聚合物的加工性能^[9,12]。表2表明加入PEG 3350对含有PEO(MW 1 000 000)和扑尔敏的热熔挤出片剂产生了显著的影响。载体骨架中加入PEG 3350可以降低加工所需的温度并能阻止聚合物的降解,因为聚合物的相对分子质量没有发生变化。据报道,在挤出时聚甲基丙烯酸酯系统使用甘油醋酸酯作为增塑剂,系统的稳定性得到了改善,而残留单体的浓度仅增加了0.003%^[6]。有报道乙基纤维素在后续处理中也相当稳定^[11]。

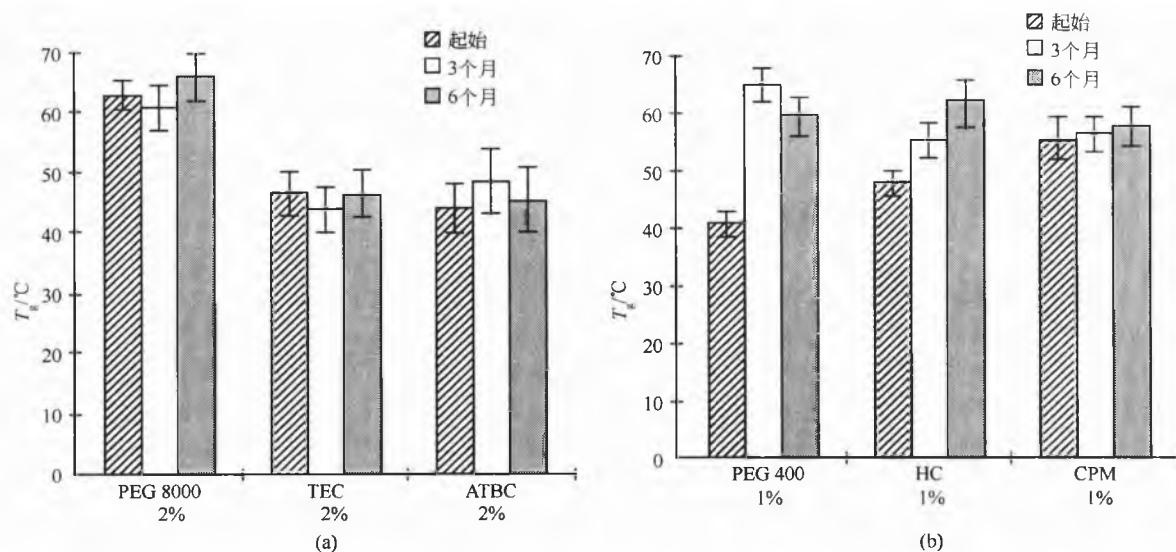


图5 (a) 含有2%PEG 8000、2%TEC和2%ATBC的HPC薄膜在1周、3个月、6个月的玻璃转化温度; (b) 含有1%PEG 400、1%HC和1%CPM的HPC薄膜在1周、3个月、6个月的玻璃转化温度^[9]

表2 在不同温度下含有 6wt% 扑尔敏的热熔挤出片的处方中聚氧化乙烯的稳定性^[12]

处方	PEO/wt%	PEG 3350/wt%	1区温度/℃	2区温度/℃	温度模具/℃	平均重均相对分子质量	标准偏差
1	94	0	100	115	130	710 000	50 000
2	54	40	70	75	85	900 000	100 000
纯聚合物	100	—	—	—	—	920 000	80 000

必须考虑增塑剂在加工和储藏时的热化学稳定性和挥发性^[9,15~17]。表3列举了这些因素。Repka 和 McGinity 证实热熔挤压薄膜中不同时间的增塑剂残留量是增塑剂类型的函数。分别将含 PEG 400 和 PEG 8000、枸橼酸三乙酯(TEC)和乙酰基枸橼酸三丁酯(ATBC)的 HPC 薄膜,在 25℃/0%RH 和 25℃/50%RH 的两种条件下考察一周(初始条件下)、三个月和六个月,将所有处方中初始加入的增塑剂的理论量与薄膜中测得的量进行比较。结果发现在考

察期间,含两种枸橼酸酯的薄膜在两种考察条件下减重最少,PEG 8000 是最稳定的增塑剂。在其他三种增塑剂中,低相对分子质量的 PEG 减重最多。在更严格的条件下(25℃/50%RH),实验期间 HPC 薄膜中仅测得 63% 的 PEG 400。这些结果表明 PEG 400 以及其他潜在增塑剂在热熔挤出和储存过程中可能会蒸发或降解。上述发现解释了 HPC 薄膜中加入 PEG 400 后机械测试结果改变的现象^[9]。

表3 180℃ 热熔挤出 HPC 薄膜在储存条件下,增塑剂的稳定性是储存条件的函数 ($n=6$)^[7]

增塑剂的类型	增塑剂占理论值的百分比 (25℃/0% RH)			增塑剂占理论值的百分比 (25℃/50% RH)		
	1周	3个月	6个月	1周	3个月	6个月
TEC	94.4	93.6	92.3	94.1	93.1	92.8
	(1.83)	(0.77)	(1.20)	(2.21)	(1.97)	(2.33)
ATBC	92.8	91.4	90.0	91.5	90.1	88.3
	(2.11)	(1.65)	(1.77)	(1.36)	(2.87)	(2.53)
PEG 8000	97.3	97.1	96.6	97.1	96.5	96.6
	(0.38)	(1.36)	(0.34)	(0.56)	(1.73)	(1.43)
PEG 400	88.7	79.1	74.3	86.1	66.5	63.0
	(3.15)	(3.82)	(2.67)	(2.18)	(2.08)	(1.98)

注:括号内是标准偏差。

在热熔挤出剂型中加入增塑剂可以改善最终剂型的物理机械性质,而在透皮用薄膜的聚合物骨架里加入增塑剂可以改善薄膜的柔软性^[8,9],增塑剂还可以影响产品的拉伸强度和弹性模量。除此之外,材料的热史也可能影响最终剂型的性质。高相对分子质量聚合物的性质通常与加至最终剂型前的加工与储存条件有关。暴露于高温潮湿条件下的聚合物可能影响不同批次材料的加工及其稳定性。已经有报道表明:加热与冷却可以影响含有 PEG 系统的物理和化学性质^[16~21]。

对于采用非聚合载体原料的系统,也要考虑相似的问题,并考虑主药与载体间的相容性。在低熔点的蜡中掺入低熔点化合物可能形成低共融混合物,也可能降低原料的熔点,最终不能形成固体剂型。据报道已经有使用巴西棕榈蜡的药物颗粒^[13,14]面世,这种颗粒含有双氯酚酸钠,能在低于巴西棕榈蜡熔点的温度下生产。蜡类和蜡类衍生物材料具有化学惰性,所以有优势^[13]。

载体材料的性质对热熔挤出剂型中药物的释放速率有决定性的作用。热熔挤压工艺中使用的很多原料是水不溶性的^[6,11,13,14],或者水合和胶凝速率较慢^[9,12],在处方中加

入辅料可以改善和调控药物的释放。添加辅料的不同物理化学性质可以实现不同的药物释放模式。Follonier 及其同事^[11]研究了多种以盐酸地尔硫草为模型化合物的聚合物系统。处方中加入添加剂后,通过提高微丸的孔隙率而增加了药物释放速率。在聚合物骨架中加入黏性诱导剂可以限制骨架体系中常见的突释效应。在载体骨架中加入离子型或 pH 依赖型的聚合物,可实现药物的零级或 pH 依赖型释放。科学家们就 AcDiSol[®]和 Explotab 等膨胀剂调整药物释放的作用进行了研究。相反,研究表明 Explotab 可以在 HPC 热熔挤出薄膜中用作“超级吸附剂”,伤口护理时可以用来吸收水和渗出物^[22]。含蜡体系中也采用了类似的调整药物释放的方法^[13,14],在双氯酚酸钠/棕榈蜡类骨架中加入羟丙纤维素、Eudragit L 和氯化钠。增加纤维素衍生物或甲基丙烯酸共聚物的含量,可以加快双氯酚酸钠的释放。与含蜡或 Eudragit L 的体系相比,双氯酚酸钠在羟丙纤维素或蜡类骨架中的释放较少依赖 pH,这是因为甲基丙烯酸的共聚物不溶于水和 pH<6 的溶液。氯化钠几乎没有膨胀作用,所以作用并不明显。

科学家们对由热熔挤出方法制备的茶碱骨架制剂的工

艺进行了详尽的研究,包括载体聚乙酸乙烯酯的性质^[23]、药物颗粒大小和载药量对药物释放的影响、聚乙酸乙烯酯的热稳定性等。首先 Zhang 和 McGinity 研磨棒状的热熔挤出物制成茶碱颗粒,然后将其与各种微晶纤维素混合压制成片。药物的颗粒大小对于压制片释放率的影响如图 6 所示。当热熔挤出茶碱/PVAc 颗粒增大时,茶碱的释放率明显减少。这是因为药物是以扩散的方式从骨架中释放,所以含有大颗粒片剂的药物扩散路径较长,释放速率降低。载药量对于含挤出颗粒的片剂的释放影响如图 7 所示。采用热熔挤出制备工艺时, PVAc 能容纳较高的固体量。值得关注的是利用热熔挤出技术能轻松地加工含有 50% 茶碱的粉末混合物。

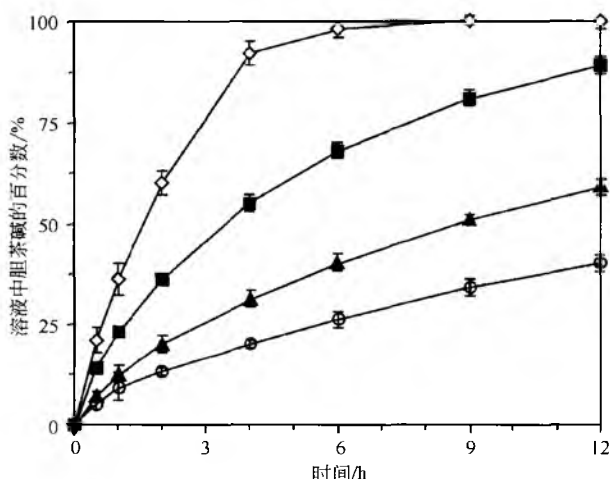


图 6 含有热熔挤出颗粒的片剂中,颗粒的大小对茶碱释放的影响 ($n=3$)。片剂中: 20% 挤出颗粒 (处方 3: 25% 茶碱, 2% PEG 和 73% PVAc), 79.5% Avicel® PH200, 0.5% 硬脂酸镁。◆ 小于 125 μm ; ■ 180~212 μm ; ▲ 300~425 μm ; ○ 500~600 μm ^[23]

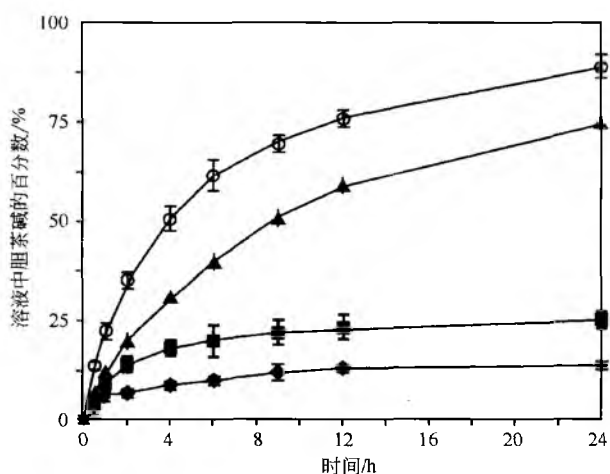


图 7 含有热熔挤压颗粒的片剂中,载药量对茶碱释放的影响 ($n=3$)。片剂中: 20% 的 300~425 μm 挤出颗粒 (处方 1~4: 茶碱, 2% PEG 和 PVAc 加至 100%), 79.5% Avicel PH200, 0.5% 硬脂酸镁。◆ 载药量 5%; ■ 载药量 15%; ▲ 载药量 25%; ○ 载药量 50%^[23]

这些研究者还利用 Plasticorder® 流变仪^[23]研究了 PVAc 剪切力的稳定性。如图 8 所示,起始峰表示热处理过程中加入的 PVAc。当槽内聚合物融化时温度上升,力矩逐渐减小。初步加热后没有观察到力矩有新的变化。该发现证实加工条件下, PVAc 不易受加热或剪切力影响而发生降解。

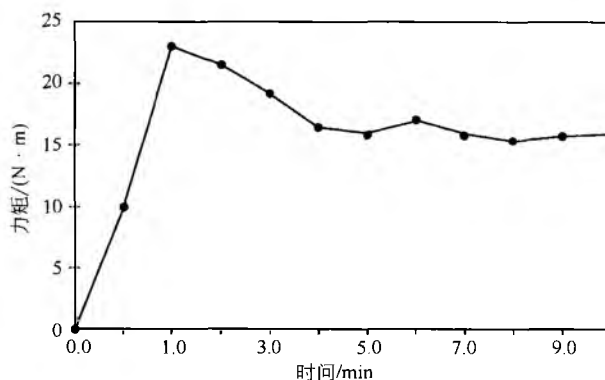


图 8 通过 Plasticorder® 流变仪监测聚乙酸乙烯酯的热稳定性和剪切稳定性

热熔挤出剂型的处方中还含有其他材料,如骨架剂和抗氧化剂等。Cuff 和 Raouf^[7]报道称将微晶纤维素加入到 PEG 8000 骨架中,可以改善射出成型片剂的黏性和塑性。加工未增塑或增塑不足的含纤维素聚合物(例如羟丙纤维素和乙基纤维素)时需要采用较高的温度,而该温度可能使聚合物发生氧化。一家材料生产商建议在低相对分子质量的羟丙纤维素的处方中加入抗氧化剂(二叔丁对甲酚或抗坏血酸等)^[24],类似的,推荐在含乙基纤维素的处方中加入抗氧化剂、弱吸收剂和酸接受体^[25]。据报道在聚环氧乙烷薄膜中加入抗氧化剂,可以避免发生自由基和氧化降解^[26]。

生产热熔挤出剂型使用的原料与传统剂型所用的药用化合物相同。虽然热熔挤出工艺加热时间较短,不会限制使用所有的不耐热化合物,但该工艺中使用的每种化合物都必须有热稳定性。增塑剂的加入可以降低热熔挤出工艺温度,从而减少药物和载体的降解。加入各种辅料可以调节药物的释放。速率调节剂可以改变主药的溶出速度。易发生氧化或自由基降解的体系在加工和存储的过程中,必须加入抗氧化剂、酸接受体和(或)弱吸收剂。

应用

制药行业在过去的 20 多年里已经认识到“连续加工”的价值。而热熔挤出则有助于实现自动控制、减少资金投入、降低劳动力成本,这使其成为值得考虑采用的技术^[27]。

和溶解/混悬^[28,29]技术一样,传统的挤出/滚圆是制备控释小丸中的一项重要工艺。20 世纪 80 年代中期, Gamlen^[27]和 Lindberg 等^[30,31]认识到这些微丸或颗粒的质量至关重要,但已有的技术不易控制孔隙率、含量均匀性和粒

径分布均匀,难以实现真正的连续加工。直到 90 年代,新加工设备的出现促进了制丸技术的发展,这也给药剂学家提供了机会,有助于他们运用科学原理设计新型制剂。

至今热熔挤出技术并未在药学文献中得到很多的关注。1969 年科学家们用原始的柱塞式挤出机制备了含有邻苯二甲酸醋酸纤维素的丸剂,并利用它研究了丸剂几何形状与溶出速率的关系^[32]。最近人们用实验规模挤出机研制了以聚乙烯和聚己酸内酯为骨架的产品^[33,34]。Mank 及其同事们在 1989 年和 1990 年报道了多种利用热塑性聚合物的挤出来生产缓释丸剂的工艺^[35,36]。Sprockel 及其同事报道了一种用于生产骨架给药系统的热熔挤出工艺^[37]。而药学文献中并没有阐述热熔挤出工艺的众多应用。

1994 年, Follonier 和他的同事研究了使用热熔挤出技术生产缓释丸片剂的可行性^[6]。图 9 展示了他们研究所用的柱塞式挤压出机。研究者的目的是提供一种简单、单一、持续的生产模式。热降解往往限制了热熔工艺的应用。盐酸地尔硫草是一种相对稳定、溶解性较好的药物,可以将其加入聚合物丸剂内制备缓释胶囊。为了获得成功的终产品,在进行处方设计前要认真筛选聚合物和增塑剂。该项研究使用的聚合物为乙基纤维素 (EC)、醋酸丁酸纤维素 (CAB)、聚(乙基丙烯酸/甲基-甲基丙烯酸/三甲基铵氯化甲基丙烯酸酯) (Eudragit RSPM) 和乙烯-醋酸乙烯共聚物 (EVAC), 增塑剂为甘油醋酸酯和邻苯二甲酸二乙酯。通过水银测孔法评价处方的孔隙率。如图 10 所示,获得的小丸表面相当光滑,孔隙率较低。如图 11、图 12 所示,地尔硫草的体外释放可分两个阶段,含有 CAB 和 EVAC 的片剂释放率最低,而 Eudragit RSPM 在 130℃ 时挤出依然稳定。而且每种处方使用的增塑剂的种类和百分比、聚合物的干燥时间、挤出温度及增塑时间都不尽相同。在后续研究中, Follonier 等考察了影响经热熔挤出制备的盐酸地尔硫草小丸释放的多种因素^[11], 包括聚合物类型、药物/聚合物比例及小丸的体积等。研究者为了调节药品的释放速率,将不同的聚合物辅料加入小丸处方中,如交联羧甲基纤维素钠 (Ac-Di-Solw) 和羧甲基淀粉钠 (Explotab) 等。还可以将这些小丸填充入硬质明胶胶囊来使用。很显然,通过优化技术和处方,用热熔挤出制备缓释小丸是一种可行的药物输送技术。

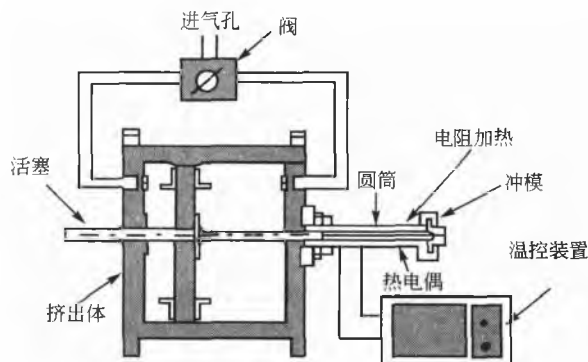


图 9 实验室柱塞式挤出机的示意图^[6]

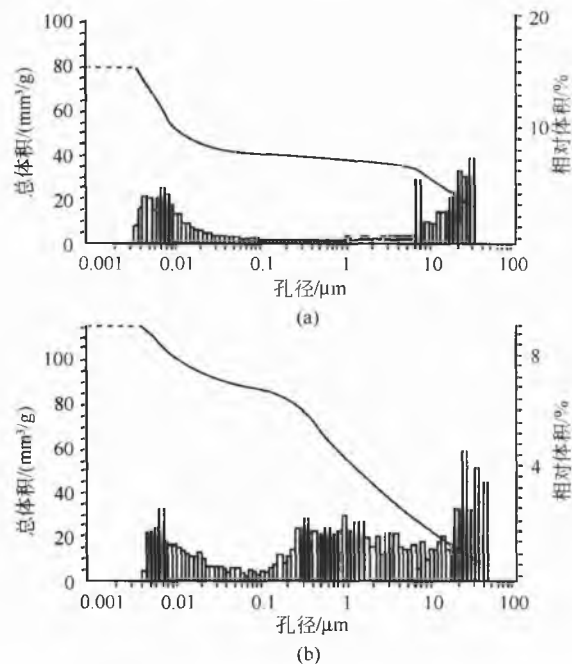


图 10 基于 Eudragit RSPM (a) 和 Elvaxr 40W (b) 的含盐酸地尔硫草片剂的汞灌注曲线和孔径分布^[6]

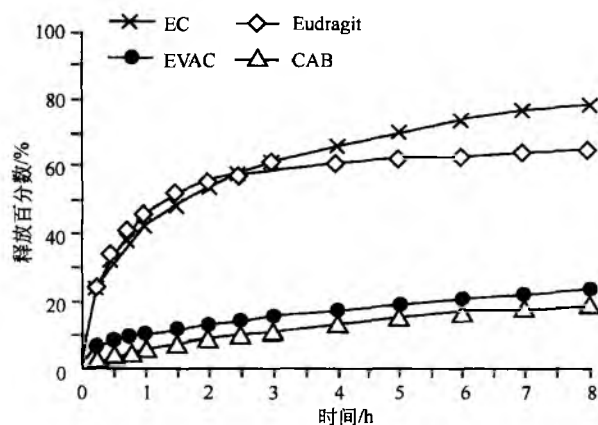


图 11 含有不同聚合物的挤出制备的盐酸地尔硫草片剂的释放性质图 (聚合物/药品=1:1; 大小: 2mm×2mm)^[6]

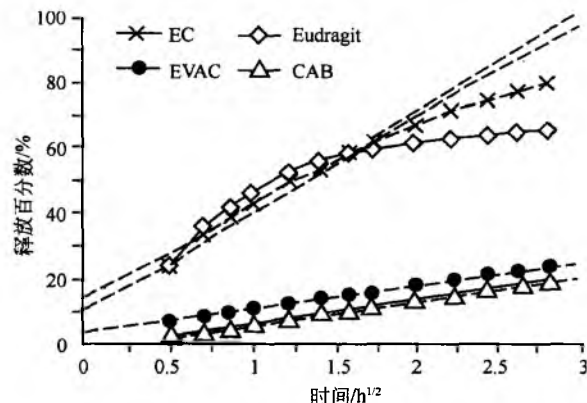


图 12 盐酸地尔硫草的释放率 (%) 是时间平方根的函数，且呈线性回归



目前制备薄膜最常用的制备方法是有机或水溶液薄膜涂布法^[8]，这类薄膜一般用于透皮/透黏膜药物给药系统和伤口护理。然而人们发现由这种方法制备的薄膜有许多问题，例如 Gutierrez-Rocca 和 McGinity 指出，用水和溶剂涂布的丙烯酸薄膜的老化会导致延展性和弹性随时间减弱，而张力增加。这种机械性质的改变与聚合物链向平衡态的舒展有关^[16]。研究者还证实，增塑剂的类型、用量、固化时间和温度对于药物从薄膜中（由水分散制得）溶出的速率有明显影响^[38~40]。

1996 年 Aitken-Nichol 及其同事研究了用热熔挤出技术制备局部给药用有弹性的丙烯酸薄膜的可行性^[8]。研究者指出该工艺的一个优点是不受溶剂限制。尽管这次研究

并没有采用真正的连续操作模式，但可能性确实存在。研究者比较了涂布薄膜与各种挤出薄膜的不同之处。表 4 的数据说明了增塑剂的类型、用量和模型药物对玻璃化转变温度（ T_g ）、高密度聚乙烯（HDPE）的机械性质和 Eudragit E100 挤出薄膜的影响。Eudragit E100 是一种经常使用的热塑性挤出聚合物。研究者发现热熔挤压技术可以用于生产丙烯酸树脂的游离薄膜。枸橼酸三乙酯可以用作该聚合物的增塑剂，除此之外研究者还发现盐酸利多卡因同样能用作丙烯酸薄膜的增塑剂。最终研究者得出结论，认为涂布薄膜与挤出薄膜在溶解度和延展性上的不同是由药物在聚合物中的溶解量不同引起的。和溶剂涂布薄膜不同，盐酸利多卡因的溶出速率受载药量影响。

表 4 含有盐酸苯海拉明（DPH）和盐酸利多卡因（L-HCL）的 Eudragit E100 薄膜的机械性质^[8]

聚合物	增塑剂	药物	$T_g/^\circ\text{C}$	d-位移/ \AA	峰值应力 (ϵ) σ /(kg/cm^2)	断裂时的延 展性 $\epsilon/\%$
E100	无	无	40	4.76	N/A	N/A
E100-Ex	15%TEC	无	18	4.92	13.4	59.3
E100-Ex	12%三乙酸甘油	无	25	4.76	29	47.9
E100-Ex	15%TEC	5%DPH	20	N/A	12.9	53.5
E100-Cast	15%TEC	5%L-HCL	20	5.03	3.65	549
E100-Ex	15%TEC	5%L-HCL	21	4.79	9.88	218
E100-Ex	15%TEC	10%L-HCL	10.5	4.80	2.47	376.8
HPDE-E100	无	5%L-HCL	35 ¹⁾	4.76 ²⁾	77.7 ³⁾	110.0 ³⁾
1:1-Ex					3.0 ⁴⁾	3.0 ⁴⁾

- 1) 为 $T_{\text{凝胶}}$ 111 $^\circ\text{C}$ 。
2) 在 4.1 \AA 、3.60 \AA 、2.49 \AA 有结晶峰。
3) 在定位的方向上测试。
4) 在定位的垂直方向上测试。
注：Ex 指挤出。

制备透皮和透黏膜的药物转运系统时，经常使用有机或水溶液涂布薄膜。Repka 及其同事讨论了这些技术的大量缺点，包括加工时间较长、影响环境以及成本较高^[9]等。研究者使用 Killion 挤出机采用热熔挤出技术制备 HPC 薄膜，在 HPC 薄膜中加入了多种增塑剂和两种模型药物。他们研究了增塑剂和药物对薄膜物理机械性质的影响。研究者发现如果缺少增塑剂，纯 HPC 薄膜就不能在挤出机的高压下挤出。表 5 阐述了多种传统增塑剂和两种模型药物对 HPC 薄膜三种机械性质的作用。除了 PEG 400 以外，其他增塑剂在研究过程中都相当稳定。虽然初始时 PEG 400 在

HPC 薄膜中表现了极好的增塑作用，但在所有的参数测试中均不稳定。表 6 列出了加工温度和存储时间对两种模型药物的影响。CPM 不仅是 HPC 薄膜极好的增塑剂（可以改善热熔挤出薄膜的机械稳定性），而且还可以长达 12 个月保持较好的化学稳定性。此外，通过差示扫描热量法证明 CPM 能完全溶于 HPC 薄膜，浓度可高达 10%（图 13）^[11]。CPM 在 HPC 薄膜中以无定形固体溶液的形式存在。与传统增塑剂相比，氢化可的松（HC）是一种优良的增塑剂，而当 HC 加入 HPC 薄膜后，其化学稳定性是加工温度与在挤出机内的停留时间的函数。

表 5 增塑剂和药品对 25 $^\circ\text{C}$ 下储存的 HPC 挤出膜抗张强度（TS）、延长百分比（%E）以及杨式模量（YM）的影响^[9]

增塑剂和药品	TS（初始值）	TS（3 个月）	TS（6 个月）
PEG 8000 2%	13.7 (1.1)	13.2 (1.3)	12.2 (0.7)
TEC 2%	17.2 (1.7)	18.9 (1.1)	20.8 (0.7)
ATBC 2%	26.1 (2.6)	19.2 (1.5)	19.6 (1.4)
PEG 400 1%	37.6 (3.5)	29.9 (2.7)	27.9 (2.1)
HC 1%	26.7 (2.7)	33.0 (2.7)	34.1 (3.8)
CPM 1%	32.7 (3.4)	32.9 (3.1)	30.8 (1.8)

续表

增塑剂和药品	%E (初始值)	%E (3个月)	%E (6个月)
PEG 8000 2%	5.01 (0.4)	4.45 (0.6)	4.39 (0.7)
TEC 2%	5.29 (0.4)	5.37 (0.4)	5.08 (0.6)
ATBC 2%	6.02 (0.6)	6.13 (0.5)	6.40 (0.7)
PEG 400 1%	6.62 (0.6)	5.25 (0.6)	5.05 (0.5)
HC 1%	5.40 (0.4)	4.82 (0.4)	4.55 (0.4)
CPM 1%	5.26 (0.4)	5.03 (0.7)	4.87 (0.7)
增塑剂和药品	YM (初始值)	YM (3个月)	YM (6个月)
PEG 8000 2%	4.25 (0.2)	4.31 (0.6)	4.21 (0.4)
TEC 2%	4.43 (0.3)	4.11 (0.4)	4.09 (0.4)
ATBC 2%	4.75 (0.6)	3.09 (0.5)	3.19 (0.4)
PEG 400 1%	4.05 (0.3)	7.13 (0.3)	6.15 (0.6)
HC 1%	6.57 (0.3)	7.98 (0.3)	8.60 (0.3)
CPM 1%	5.38 (0.3)	4.44 (0.4)	4.64 (0.3)

注：括号内是标准偏差； $n=6$ 。

表 6 25℃时储存和加工温度对 HPC 挤压薄膜 ($n=6$) 中扑尔敏 (CPM) 和氢化可的松 (HC) 百分比的影响^[9]

温度/℃	CPM		
	1 周	6 个月	12 个月
170	98.6 (1.6)	98.5 (1.9)	98.4 (1.9)
180	98.5 (1.9)	98.5 (2.1)	98.1 (2.4)
190	98.1 (2.2)	97.6 (2.7)	97.3 (2.5)
200	97.9 (2.3)	97.7 (2.2)	97.6 (2.3)
温度/℃	HC		
	1 周	6 个月	12 个月
170	93.9 (2.3)	92.4 (3.0)	91.4 (2.4)
180	87.7 (2.2)	83.1 (2.8)	79.9 (2.2)
190	75.9 (3.2)	70.7 (2.7)	71.6 (2.4)
200	70.2 (3.8)	68.8 (3.3)	62.9 (3.1)

注：括号内是标准偏差。

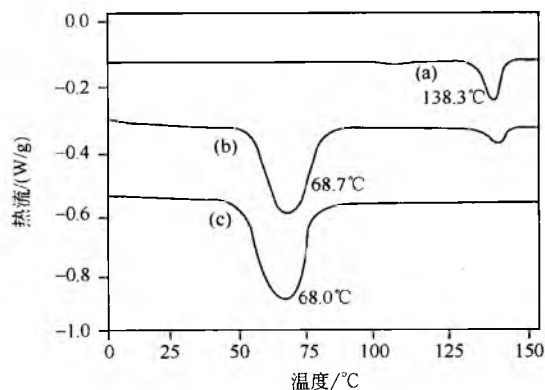


图 13 含有扑尔敏和羟丙基纤维素的热熔挤压薄膜的差示扫描量热图。(a) 扑尔敏 (CPM)；(b) 10%CPM 和 90%HPC (Klucel HF) 物理混合；(c) 10%CPM 和 90% 的 HPC (Klucel HF) 挤压薄膜^[17]

Repkaey 及其同事^[9]在薄膜试验中发现了相反的关

系。如图 14 所示，同沿流动方向测试相比，当垂直于流动方向测试时，所有挤出薄膜的拉伸强度明显减小，而延长百分比显著增加。这与 Aitken-Nichol 等^[8]的发现相反^[8]。这些研究者发现与垂直方向相比，水平方向测试时高密度聚乙烯/Eudragit E100（聚合物比例 50：50，含 5% 盐酸利卡多因）挤出薄膜的拉伸强度与延长百分比均增加了 25~35 倍^[15]。两项研究结果的差异可归因于两种聚合物相容性较差。这种机械性质的差异表明，使用挤出薄膜设计药物转运系统或应用于伤口护理时，流动方向很重要。

维生素 E TPGS NF (D- α -生育酚聚乙二醇 1000 琥珀酸酯) 在药剂中应用广泛，其化学结构中既有亲脂性又有亲水性部分，这使它更像传统的表面活性剂。因为 TPGS 可以用作增溶剂、吸收促进剂和潜在的控释药物的载体，所以可采用热熔挤出技术将其加入透皮和透黏膜制剂^[41]。Repka 和 McGinity 用 Randcastle 挤出机（型号 #750）制备了两种薄膜，都含羟丙纤维素和聚氧化乙烯，但一种含添

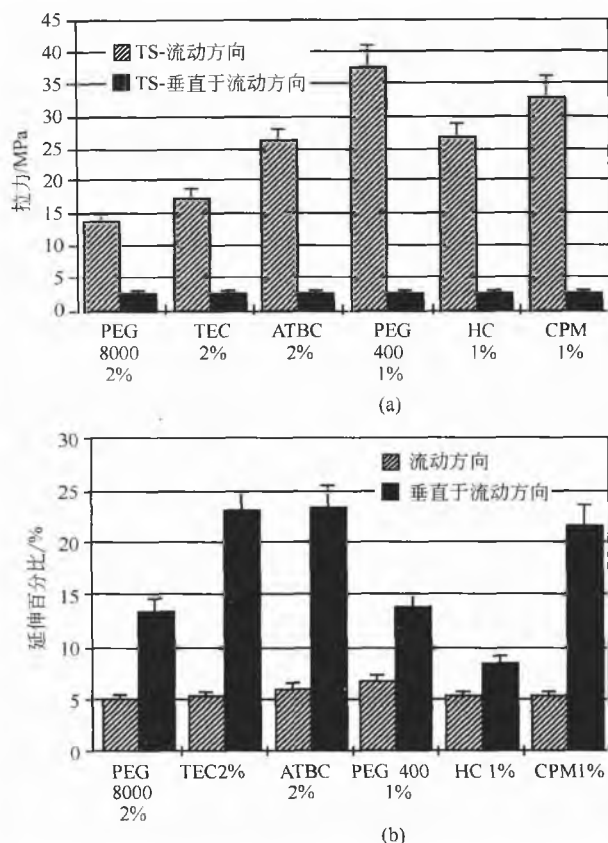


图 14 (a) 在流动方向和垂直于流动的方向分别测定含有不同增塑剂和药品的 HPC 薄膜的抗张强度的测试情况; (b) 流动方向和垂直于流动的方向分别测定含有不同增塑剂和药品的 HPC 薄膜的延伸百分比的测试情况

表 7 以维生素 E TP GS 为添加剂的羟丙基纤维素和聚乙烯氧化物比例为 50 : 50 的热熔挤出薄膜的加工条件 ($n=4$)^[17]

维生素 E TP GS / %	熔点/℃	压力/psi	最大驱动功率/W	扭矩/(N · m)	螺杆转速/(r/min)
0	180	>3000	>4.00	超载	25
0	190	2100	3.84	40	40
1	180	1800	3.06	33	40
3	180	1500	2.61	28	40
5	180	1100	2.07	21	40

Zhang 和 McGinity^[12] 介绍了热熔挤出的另一种用途。研究者研究了聚氧化乙烯 (PEO) 用作药物载体的性质和扑尔敏 (CPM) 在骨架片中的释放机制。在挤出片中加入增塑剂 PEG 3350, 方便加工。该项研究中, 主要挤压聚合物 PEO 的稳定性是加工温度的函数 (表 2)。同样, 聚合物的类型、温度和在挤出机滞留的时间也很重要。研究者指出药物、聚合物以及其他成分, 在约 2 分钟的升温过程中 (即粉末在设备里混合的过程) 必须保持稳定。此外, 在挤出机圆筒内各种成分将再次混合, 因为挤出片剂的含量均匀度的范围为理论值的 99.0%~101.0%。图 16 显示了 PEG 3350 对 CPM 从挤出骨架片中释放的影响。可以看出随 PEG 3350 百分比的增加, CPM 的释放速率也增加。聚乙二醇的结构单元与 PEO 一样, 但比 PEO 的相对分子质

量低。因此 PEG 3350 的水合和溶解比 PEO 更快。增塑剂的存在加速了整个骨架体系的水合作用和溶解速率。载药量对 CPM 释放的影响如图 17 所示。研究发现当药物的含量从 6% 增长到 12% 时, 药物释放百分比并没有随时间改变。而当载药量增加到 20% 时, 仅有少量的增加。该项研究表明热熔挤出片剂的溶出具有重现性。

用于口腔内给药的生物黏附性热熔挤出薄膜及其加工工艺已申请了专利^[42,43]。这些薄膜可用于透黏膜甚至透皮的给药系统中。该类薄膜可以单独生产, 挤出后再复合; 在某些情况下, 多层系统可以连续挤出。目前市场上有一种挤出薄膜设备, 可以用来做义齿黏胶。该系统含有一种热塑性聚合物, 薄膜润湿后这种聚合物具有生物黏附性。但在使用、润湿薄膜前, 它可以用手拿, 可以成形和切割。

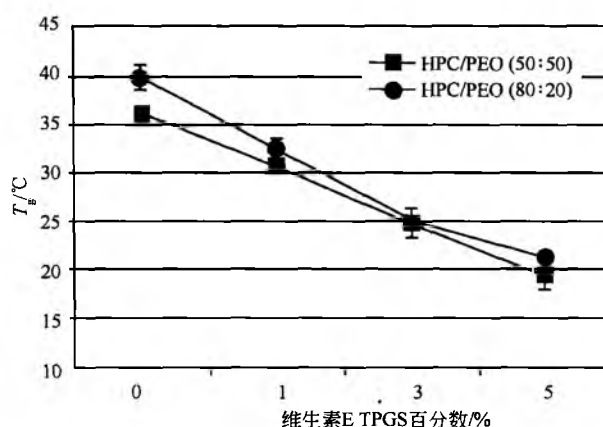


图 15 含有不同量的维生素 E TP GS 的两种处方的 HPC/PEO 热熔挤出膜 ($n=4$) 玻璃化转变温度^[41]

量低。因此 PEG 3350 的水合和溶解比 PEO 更快。增塑剂的存在加速了整个骨架体系的水合作用和溶解速率。载药量对 CPM 释放的影响如图 17 所示。研究发现当药物的含量从 6% 增长到 12% 时, 药物释放百分比并没有随时间改变。而当载药量增加到 20% 时, 仅有少量的增加。该项研究表明热熔挤出片剂的溶出具有重现性。

用于口腔内给药的生物黏附性热熔挤出薄膜及其加工工艺已申请了专利^[42,43]。这些薄膜可用于透黏膜甚至透皮的给药系统中。该类薄膜可以单独生产, 挤出后再复合; 在某些情况下, 多层系统可以连续挤出。目前市场上有一种挤出薄膜设备, 可以用来做义齿黏胶。该系统含有一种热塑性聚合物, 薄膜润湿后这种聚合物具有生物黏附性。但在使用、润湿薄膜前, 它可以用手拿, 可以成形和切割。

这种薄膜能通过热熔挤出技术实现一步连续生产。

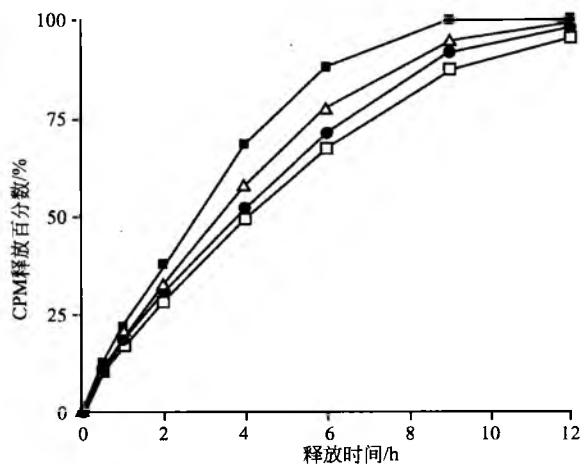


图 16 用美国药典方法 II 在 900mL 纯水, 37°C, 100r/min 条件下, 测试 PEG 3350 对在骨架片中扑尔敏释放的影响。□6% CPM, 0% PEG3 350 和 94% PEO (1.0 m); ●6% CPM, 0% PEG 3 350 和 88% PEO (1.0 m); △6% CPM, 20% PEG 3 350 和 74% PEO (1.0 m); ■6% CPM, 40% PEG 3 350 和 54% PEO (1.0 m) [12]

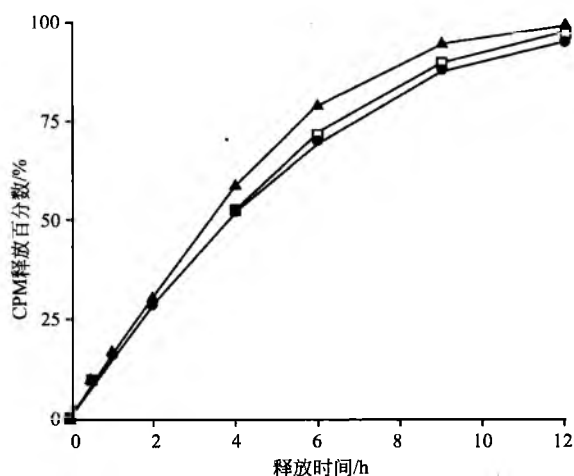


图 17 用美国药典方法 II 在 900mL 纯水, 37°C, 100r/min 条件下, 在最初 6 小时内, 测定载药量对在骨架片中扑尔敏释放的影响。●6% CPM, 94% PEO (1.0 m); □12% CPM, 88% PEO (1.0 m); ▲20% CPM, 80% PEO (1.0 m) [12]

因为具有生物黏附性的聚合物薄膜本身具有黏附性, 所以体系中不需另外加入黏性层, 从而可以简化剂型设计、降低制备成本。薄膜具有足够的黏附强度, 才可以在使用部位滞留。但是生物黏附性是一种较难测定的现象。测试方法和测定的性质一样都有问题。在开发透皮、透黏膜以及伤口治疗用薄膜产品时, 薄膜的物理机械性质和生物黏附性是重要的参数。Repka 和 McGinity 采用 Chatillon 测试仪, 在受试者身体上测试含不同添加剂的 HPC 的热熔挤出薄膜的生物黏附性。图 18 是此试验中所用设备的示意图。

图 19 是此生物黏附测试中力偏移曲线的例子。研究者发现黏附力、黏合失败时的延展力和黏附系数是挤出薄膜中添加剂类型的函数。热熔挤出薄膜黏附力的测定结果如图 20 所示。可以看出, 含有卡波姆 971P (Carbopol® 971P) 和聚卡波非 (Noveon AA-1®) 的薄膜黏附力最强。该研究证明在骨架中加入生物黏附材料后, 可以制备单层的 HPC 薄膜, 不需要独立的黏附层, 简化透皮透黏膜给药系统的加工工艺。

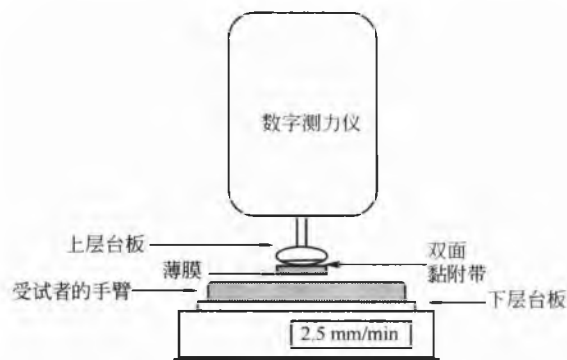


图 18 进行受试者臀部生物黏附试验的 Chatillon 装置示意图 [22]

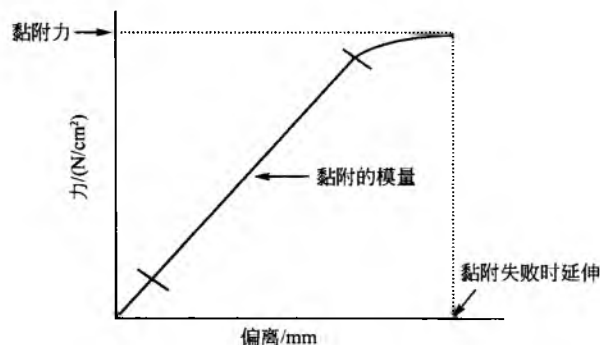


图 19 利用附着于移动试验架上的 Chatillon 数字力表, 进行热熔挤出薄膜在体臀部生物黏附试验得到的力偏移曲线 [22]

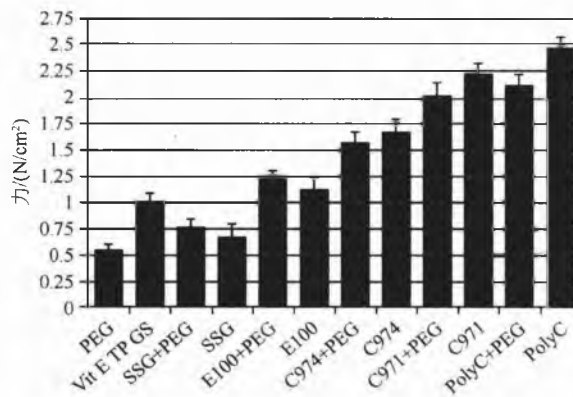


图 20 含有不同聚合物作添加剂的羟丙基纤维素热熔挤出薄膜的黏附力 (12 种聚合物, $n=6$)

Miyagawa、Sato 和同事们在 1996 年和 1997 年研究了双氯芬酸的控释及释放机理 [13,14]。研究者使用双螺杆混合

挤出机制备了一种由巴西棕榈蜡、模型药物和其他释放速率调节剂组成的蜡骨架颗粒。他们首次研究发现即使在低于蜡类熔点的温度下,也可以制得具有高机械强度的蜡骨架。颗粒处方对双氯芬酸在蜡骨架颗粒中的溶出影响非常大。处方中用来控制释放速率的添加剂多种多样,包括羟丙纤维素、甲基丙烯酸共聚物(Eudragit L100)和氯化钠等。研究者强调了使用双螺杆挤出机制备蜡骨架片的优点,如温度较低、高揉搓分散能力以及在材料挤出机内停留时间较短。在第二次研究中,研究人员得出结论:释放调节剂对采用挤出技术制备的蜡骨架颗粒的性质有重要影响,而释放调节剂的选择要以理化性质(如溶解度和膨胀

性)为基础。

Koleng 和 McGinity^[44]利用热熔挤出技术制备速释颗粒。在该项研究中,热熔挤出工艺用于制备对乙酰氨基酚颗粒,所用填充剂是低相对分子质量的聚乙二醇。制得的颗粒与另外的辅料(崩解剂和润滑剂)混合,压成片剂。表8列出了用热融挤出技术制备含15%~25%聚乙二醇6000的颗粒和片剂的释放性质。与片剂相比,颗粒剂改善了药物的释放情况。含有15%聚乙二醇片剂在30分钟后释放的对乙酰氨基酚大于载药量的80%,这符合美国药典23版对乙酰氨基酚片剂的要求。



表8 在37℃,浆速为50r/min,900mL 50mmol/L的磷酸盐缓冲液中,以PEG 6000为热黏合剂的经热熔挤出制备的颗粒剂和片剂中扑尔敏的释放情况

时间/min	15% PEG 6000		20% PEG 6000		25% PEG 6000	
	颗粒剂/%	片剂/%	颗粒剂/%	片剂/%	颗粒剂/%	片剂/%
5	85.0	18.1	77.1	15.5	79.3	17.4
15	95.5	53.0	99.0	45.3	94.2	35.8
30	98.5	91.4	100.0	77.7	100.0	65.5
45	99.2	95.9	—	95.1	—	86.2
60	100.0	100.0	—	100.0	—	97.8

总结

尽管热熔挤出是制药行业中一项相对较新的技术,但该技术已经引起了广泛关注,并用于改良许多不同剂型和体系的生产。热熔挤出技术可用于制备速释和缓释剂型,包括颗粒剂、丸剂和片剂。在生产给药系统和伤口护理用薄膜方面,该技术也有许多优势。热熔挤出还可以加工那些受溶解度限制导致生物利用度较低的新化学实体。这些药物包括处方药和非处方药。同传统方法相比,热熔挤出技术有许多优点。对于药剂学家来说,热熔挤出技术是一项令人振奋的挑战,因为它缩短了终产品的加工时间并提高了效率,在加工过程中由于不使用溶剂(包括回收使用的可能性)而具有环保优势,同时也提高了患者药物输送的效率。

参考文献

1. Kaufman, H. S.; Falcetta, J. J. Introduction to Polymer Science and Technology. An SPE Textbook; John Wiley & Sons: New York, 1997.
2. Kruder, G. A. Encyclopedia of Chemical Technology; John Wiley & Sons: New York, 1996.
3. Rauwendaal, C. Polymer Extrusion; Hanser/Gardner Publications; Cincinnati OH, 1994.
4. Nielsen, L. E. Polymer Rheology; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1977.

5. Tadmor, Z.; Klein, I. Engineering Principles of Plasticating Extrusion; Van Nostrand Reinhold Company: New York, 1970.
6. Follonier, N.; Doelker, E.; Cole, E. T. Evaluation of Hot-Melt Extrusion as a New Technique for the Production of Polymer-Based Pellets for Sustained Release Capsules Containing High Loading of Freely Soluble Drugs. Drug Dev. Ind. Pharm. 1994, 20 (8), 1323—1339.
7. Cuff, G.; Raouf, F. A Preliminary Evaluation of Injection Molding as a Technology to Produce Tablets. Pharm. Tech. June, 1998, 97—106.
8. Aitken-Nichol, C.; Zhang, F.; McGinity, J. W. Hot-Melt Extrusion of Acrylic Films. Pharm. Res. 1996, 13, 804—808.
9. Repka, M. A.; Gerding, T. G.; Repka, S. L.; McGinity, J. W. Influence of Plasticizers and Drugs on the Physical-Mechanical Properties of Hydroxypropylcellulose Films Prepared by Hot-Melt Extrusion. Drug Dev. Ind. Pharm. 1999, 25 (5), 627—635.
10. Grünhagen, H. H.; Müller, O. Melt Extrusion Technology. Pharm. Manu. Int. 1995, 1, 167—170.
11. Follonier, N.; Doelker, E.; Cole, E. T. Various Ways of Modulating the Release of Diltiazem Hydrochloride from Hot-Melt Extruded Sustained Release Pellets Prepared Using Polymeric Materials. J. Controlled Release 1995, 36, 243—250.

R

12. Zhang, F.; McGinity, J. W. Properties of Sustained Release Tablets Prepared by Hot-Melt Extrusion. *Pharm. Dev. Tech.* 1998, 4 (2), 241—250.
13. Miyagawa, Y.; Okabe, T.; Yamaguchi, Y.; Miyajima, M.; Sunada, H. Controlled-Release of Diclofenac Sodium from Wax Matrix Granule. *Int. J. Pharm.* 1996, 138, 215—254.
14. Sato, H.; Miyagawa, Y.; Okabe, T. Dissolution Mechanism of Diclofenac Sodium from Wax Matrix Granules. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86, 929—934.
15. Price, J. C. Polyethylene Glycol. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*; Wade, A., Weller, P. J., Eds.; American Pharmaceutical Association: Washington DC, 1994; 355—361.
16. Gutierrez-Rocca, J. C.; McGinity, J. W. Influence of Aging on the Physical-Mechanical Properties of Acrylic Resin Films Cast from Aqueous Dispersions and Organic Solutions. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1993, 19, 315—332.
17. Repka, M. A. Physical-Mechanical and Chemical Properties of Topical Films Produced by Hot-Melt Extrusion; The University of Texas at Austin: Austin Texas, 2000.
18. Lin, C.; Cham, T. Compression Behavior and Tensile Strength of Heat-Treated Polyethylene Glycols. *Int. J. Pharm.* 1995, 118, 169—179.
19. Craig, D. Q. M.; Newton, J. M. Characterisation of Polyethylene Glycols Using Differential Scanning Calorimetry. *Int. J. Pharm.* 1994, 74, 33—41.
20. McGinity, J. W.; Maincent, P.; Steinfink, H. Crystallinity and Dissolution Rate of Tolbutamide Solid Dispersions Prepared by the Melt Method. *J. Pharm. Sci.* 1984, 73, 1441—1444.
21. Fassihi, A. R.; Davies, P. J.; Parker, M. S. Effect of Punch Pressure on the Survival of Fungal Spores During the Preparation of Tablets from Contaminated Raw Materials. *Zbl. Pharm.* 1997, 116, 1267—1271.
22. Repka, M. A.; McGinity, J. W. Physical—Mechanical, Moisture Absorption and Bioadhesive Properties of Hydroxypropylcellulose Hot-Melt Extruded Films. *Biomaterials* 2000, 21 (14), 1509—1517.
23. Zhang, F.; McGinity, J. W. Properties of Hot-Melt Extruded Theophylline Tablets Containing Poly (vinyl Acetate). *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2000, 29 (6), 938—948.
24. Klucel® Hydroxypropylcellulose; Physical and Chemical Properties. Technical Bulletin; Hercules, Inc.; Wilmington DE, 1997.
25. Aqualon® Ethylcellulose (EC); Physical and Chemical Properties. Technical Bulletin; Hercules, Inc.; Wilmington DE, 1996.
26. Bailey, F. E.; Koleske, J. V. *Poly (ethylene oxide)*; Academic Press: New York, 1976.
27. Gamlen, M. Continuous Extrusion Using a Raker Perkins MP50 (Multipurpose) Extruder. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1986, 12, 1701—1713.
28. Reynolds, A.; *Manf. Chem.* 1970, 41, 40—44.
29. Harris, M. R.; Ghebre-Sellassie, I. Aqueous Polymeric Coating for Modified Release Oral Dosage Forms. *Aqueous Polymeric Coatings For Pharmaceutical Dosage Forms*; McGinity, J. W., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1997; 79.
30. Lindberg, N. O.; Tufvesson, C.; Olbjer, L. Extrusion of an Effervescent Granulation with a Twin Screw Extruder, Baker Perkins MPF 50 D. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1987, 13, 1891—1913.
31. Lindberg, N. O.; Tufvesson, C.; Holm, P.; Olbjer, L. Extrusion of an Effervescent Granulation with a Twin Screw Extruder, Baker Perkins MPF 50 D. Influence on Intragranular Porosity and Liquid Saturation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1998, 14, 1791—1798.
32. Rippie, E. G.; Johnson, J. R. Regulation of Dissolution Rate by Pellet Geometry. *J. Pharm. Sci.* 1969, 58, 428—431.
33. Shivanand, P.; Hussain, A. S.; Sprockel, D. L. Factors Affecting Release of KCl from Melt Extruded Polyethylene Disks. *Pharm. Res.* 1991, 8, S—192.
34. Prapaitrakul, W.; Sprockel, D. L.; Shivanand, P.; Sen, M. Development of a Drug Delivery System Through Melt Extrusion. Abstracts of the 4th AAPS, *Pharm. Res.*; Atlanta, GA; 6, S98.
35. Mank, R.; Kala, H.; Richter, M. Darstellung Wirkstoffhaltiger Extrusionsformlinge Auf Der Basis Von Thermoplasten., Teil 1, Untersuchungen Zur Wirkstoffliberation. *Pharmazie* 1989, 44, 773—776.
36. Mank, R.; Kala, H.; Richter, M. Darstellung Wirkstoffhaltiger Extrusionsformlinge Auf Der Basis Von Thermoplasten., Teil 2, Untersuchungen Zur Optimierung Der Wirkstofffreigabe. *Pharmazie* 1990, 45, 592—593.
37. Sprockel, O.; Sen, M.; Shivanand, P.; Prapaitrakul, W. A Melt-Extrusion Process for Manufacturing Matrix Drug Delivery Systems. *Int. J. Pharm.* 1997, 155, 191—199.
38. Steuernagel, C. R. Latex Emulsions for Controlled Drug Delivery. *Aqueous Polymeric Coatings For Pharmaceutical Dosage Forms*; McGinity, J. W., Ed.; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1989.
39. Factors Affecting Drug Release from Sustained-Release Film-Coated Pellets Using Acrylic Aqueous Dispersions 6th International Conference on Pharmaceutical Technology, Paris, France, June 2—4, 1992.

40. Schmidt, P. C.; Niemann, F. The MiniWiD-Coater. III. Effect of Application Temperature on the Dissolution Profile of Sustained-Release Theophylline Pellets Coated with Eudragit RS 30 D. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1993, 19, 1603—1612.
41. Repka, M. A.; McGinity, J. W. Influence of Vitamin E TPGS on the Properties of Hydrophilic Films Produced by Hot-Melt Extrusion. *Int. J. Pharm.* 2000, 202 (1—2), 63—70.
42. Schiraldi, M. T.; Perl, M. M.; Rubin, H. Bioadhesive Extruded Film for Intra-Oral Drug Delivery and Process. US Patent 4, 713, 243, December 15, 1987.
43. Schiraldi, M. T.; Perl, M. M.; Rubin, H. Bioadhesive Extruded Film for Intra-oral Drug Delivery and Process. US Patent RE33, 093, October 17, 1989.
44. McGinity, J. W.; Koleng, J. J. Preparation and Evaluation of Rapid-Release Granules Using a Novel Hot-Melt Extrusion Technique, Abstracts of the 16th Pharmaceutical Technology Conference, Athens Greece, 1997; 2 153.
45. Dahl, T. C. Ethylcellulose. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*; Wade, A., Weller, P. J., Eds.; American Pharmaceutical Association; Washington DC, 1994; 186—190.
46. Harwood, R. J.; Johnson, J. L. Hydroxypropylcellulose. In *Handbook of Pharmaceutical Excipients*; Wade, A., Weller, P. J. Eds.; American Pharmaceutical Association; Washington DC, 1994; 223—228.
47. Braun, D. B.; DeLong, D. J. Polyethers (Ethylene Oxide Polymers). *Encyclopedia of Chemical Technology*; Kirk-Othmer, Ed.; John Wiley & Sons, Inc.; New York; 1982; 616—632.
48. Shukla, A. J. Polymethacrylates. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*; Wade, A., Weller, P. J., Eds.; American Pharmaceutical Association; Washington DC, 1994; 362—366.
49. Kobayashi, N. H. Carnauba Wax. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*; Wade, A., Weller, P. J., Eds.; American Pharmaceutical Association; Washington DC, 1994; 552—553.

(杨 莉 译)



R

热原和细菌内毒素检查

James F. Cooper

Charles River Endosafe, Charleston, South Carolina, U. S. A.

引言

热原是使产生发热反应的物质的总称,一定量的热原进入循环系统后,便可导致发热反应。细菌内毒素因为活性强且普遍存在,是最重要的热原,因此在制药领域细菌内毒素检查法已经逐步取代了家兔热原试验。

1. 静脉内给药和热原质的早期研究

1656年,Christopher Wren 爵士开始静脉给药治疗,我们便意识到热原的存在^[1a,1b]。随后在18世纪后期和19世纪早期,由于实验医学的发展,许多文献都描述了伴随人体静脉滴注治疗而频繁出现的发热症状,但滴注治疗引起发热的原因却未能找到。因为开放性伤口或外科手术部位的组织的腐烂经常能引起腐烂热或伤口热,所以医生们猜测在发酵或腐败的过程中产生了热原。在Louis Pasteur (1822~1895年)发现细菌能引致感染的同时也能引起发酵后,人们便把热原和细菌联系在一起了,但当时人们仍然不清楚热原是细菌的产物还是细菌本身的一部分。将细菌性热原与医学联系起来已有文献综述^[2~4]。

对细菌性热原的化学、生理和药理特性的研究始于一个多世纪之前。1894年Centanni从多种细菌中,包括埃希氏大肠杆菌和伤寒杆菌,提取了致热物质^[5],他的研究结果显示细菌性热原不仅具有热稳定性而且不是蛋白质类物质。Hort和Penfold于1912年发表的论文对注射致热的本质进行了当时最好的阐述^[6~8]。他们采用家兔将发热反应分析标准化,运用这种发热反应分析方法和革兰氏染色法,证明了能产生热原质细菌主要是革兰氏阴性菌(GNB),而不产生热原的细菌主要是革兰氏阳性菌。他们发现实验所用的蒸馏水的致发热活性往往与细菌计数相关,实验显示死亡的革兰氏阴性菌也能导致发热。从而,他们推断引起所有注射发热的是一种可滤过、对热稳定的细菌产物。

Seibert在1923~1925年的经典研究中最终明确了注射发热是由对热稳定、可滤过的GNB成分引起的^[4,9~11]。她甚至成功地开发了一套连续制备能通过家兔热原分析的输液的工艺。

2. 大容量输液的出现

Seibert的制备无热原静脉(IV)输液的方法,使医院药房配制出的溶液可安全地用于患者治疗^[10,11]。在第二次世界大战前的十年中,她的制备方法甚至开创了大容量输液(LVP)商品的工业化生产。如今,大容量输液的生产依赖于大量的无热原水,即注射用水,通常用蒸馏法制

备。原料要经确认无热原后,才可加入注射用水中。证实无热原后,原料与注射用水在去热原配液罐中混合,然后经灌装设备分配至每个去热原容器中,这些已灌装的容器马上进入高压灭菌器中消毒,防止任何可能存在的GNB或其他产热原微生物的滋生。

热原的特性

“热原”一词多用于描述对制药工业最重要的GNB内毒素。热原也可泛指经静脉给药或吸入给药后引起发热的物质。如何区分非微生物和微生物热原很重要。非微生物热原包括一些药物,如博来霉素、秋水仙素和多聚核苷酸poly-I: C。对于敏感的患者来说,人血液制品可能成为抗原,比如人血清白蛋白、青霉素类药物或其他治疗药物^[12,13]。

微生物热原对于制药企业来说是至关重要的问题。细菌(死亡或存活的)、真菌、疟原虫和活病毒都可成为热原。另外,细菌产物如链球菌外毒素、葡萄球菌内毒素和细菌内毒素脂多糖(LPS),以及真菌产物都可成为热原^[13]。因为LPS存在很小量时即产生毒性,所以GNB内毒素对于制药企业是最重要的微生物热原。USP内毒素参考标准品在人和家兔引起发热的初始值约为1ng/kg^[14]。当大量的细菌细胞进入血流时,巨噬细胞可将它们吞噬,从而引起发热。对于多数致热性GNB,至少需要10 000个/kg才能引起家兔的热原反应^[15],而对于革兰氏阳性菌或真菌则需要10~10⁸个/kg才能引起同样的反应^[12,16,17]。

1. 导致发热的机理

内毒素热原通过间接作用引起发热。内毒素进入循环系统后,与LPS结合蛋白(LPB)相结合,后者将其转运至网状内皮系统的受体细胞。作为主要靶细胞的单核细胞能合成多种致炎症因子,如白介素-1(IL-1)、白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)^[18,19]。这些细胞因子参与急性和慢性炎症反应,引起发热,并调控宿主对细菌感染的反应^[20]。

2. 细菌内毒素热原

细菌内毒素是一种大分子复合物,是构成GNB细胞壁的一种主要成分。这些细菌在增殖过程中不断地向周围释放内毒素,甚至在死亡崩解时也会释放内毒素^[21]。因此,细菌内毒素可以细胞相连的形态和游离态两种形式存在。溶液中细胞相连形态的内毒素可被微孔滤膜滤除,但游离态的内毒素却可轻易通过大多数除菌滤膜。因细菌内毒

素对热稳定,故常规的高压蒸汽消毒法不能完全破坏它。内毒素无处不在,只要有 GNB 存在的地方均可见其踪影。在土壤、食物、地面水里以及与这些物质接触的表面均可找到内毒素。因为在水系统中增殖的绝大多数细菌属革兰氏阴性,所以在普通水中发现细菌内毒素就不足为奇了。鉴于此原因,内毒素就成为实验室和潮湿的生产场所中常见的污染物,包括实验用玻璃器皿、研究用设备和水浴等。它可污染采样设备、储存容器和任何重复使用的潮湿材料。

3. 内毒素的结构和化学性质

天然的细菌内毒素含有 GNB 细胞壁中的脂类、糖类和蛋白质类成分(图 1),而商业化的内毒素产品是经过多道程序提取纯化的,其中不含有核酸、蛋白质、磷脂和其他细菌细胞成分^[21]。内毒素经纯化后最基本的化学结构为多糖与一种称为脂质 A 的成分共价结合。基于其化学性质,这一物质被称为脂多糖。尽管“内毒素”和“脂多糖”两个

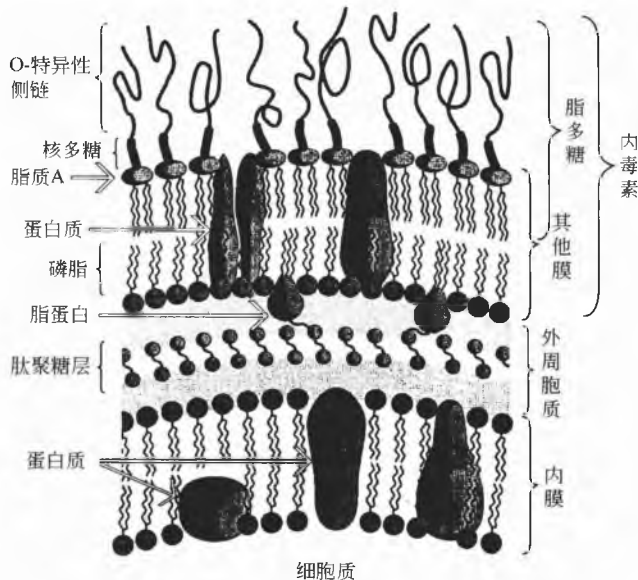


图 1 革兰氏阴性菌的细胞膜,包括外膜的脂多糖、蛋白质和磷脂(O-特异性指寡糖特异性)

术语在使用时常可互换,但多数内毒素参比标准品为纯化物,脂多糖这一称法似更确切。

脂质 A 嵌在细菌细胞壁中,而多糖结构则伸向外侧^[21]。多糖成分由两部分组成,即与脂质 A 结合的核心多糖和较长的 O-特异性链,此链附着在核心多糖上(图 2)。O-特异性链是整个复合物中最多变的成分,它由 20~40 个重复单位组成,每个单位包含至多 8 个单糖,GNB 能引起宿主特异性免疫反应,该链起了主要作用。核心多糖相对稳定得多,虽然在内毒素缺乏 O-特异性链时,它也可诱发抗体生成,但它对宿主的影响不如特异性链那么深远。核心多糖可分为内核心和外核心,前者附着在脂质 A 上,后者与 O-特异性链连接。前者引起研究者较大兴趣,因为它含有两个独特的单糖,庚糖和 3-脱氧-D-2-辛酮糖酸(KDO)。KDO 将核心多糖与脂质 A 连接起来,且存在于所有的内毒素中。除了一些特殊的植物和海藻外,自然界其他地方不再发现有 KDO^[22]。

脂质 A 是脂多糖中最稳定的成分,它含有一个二氨基葡萄糖,被连有酰胺基和酯基的长链脂肪酸所取代,每条链含有 14 个碳^[21]。在已知的内毒素生物学活性中,脂质 A 起了相当大的有害和有益的作用。图 2 列举了部分生物学活性。

4. 内毒素的生物学特性

由于细菌内毒素具有广泛和迥异的生物学特性和活性,从而吸引研究者研究了多年。内毒素是一种有效的物质,一旦病原 GNB 侵入宿主释放出内毒素,它就能引起广泛的有害生理反应^[21]。最严重时,它们可深刻地改变器官功能,出现低血压和弥散性血管内凝血等症状,这些症状将导致严重的病情或死亡。而另一方面,内毒素又是哺乳动物免疫系统的活性刺激剂,可增强人体对抗微生物感染和恶性肿瘤的能力。这一生物学特性的两面性吸引着科学家们试图改变脂质 A 的成分,以减轻或消除它的毒性作用而保留它有利的一面^[23]。

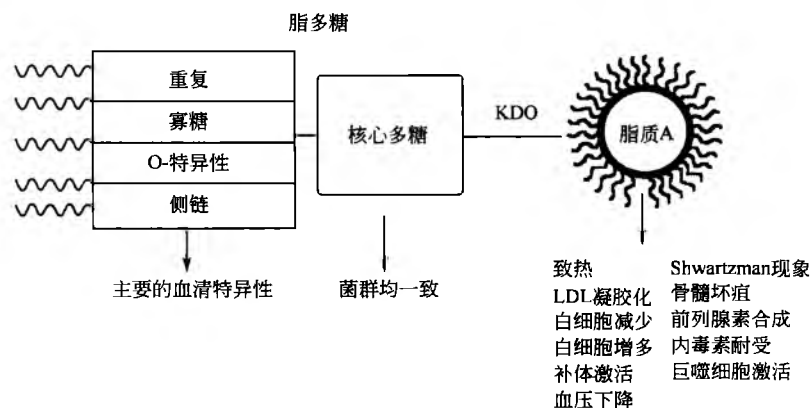


图 2 脂多糖的主要成分及生物学活性

R

4.1 发热

发热是内毒素引起的最引人注目的生物反应之一,也是最易测量的指标之一。因此,发热成为内毒素引起的众多生理反应中被研究得最多和了解得最透彻的一种反应。已知的发热病理见图 3^[21]。当外源性的热原进入血流中,可通过细胞吞噬作用将其清除出循环系统。宿主的吞噬细胞(主要是外周血单核细胞)由此被激活,合成一系列的细胞因子(或内源性热原),释放入血循环中。内源性热原顺着动脉血流来到下丘脑——人体的体温调节中枢。在此内源性热原可诱使多种细胞中花生四烯酸代谢产物的增加(主要有环氧化后生成的前列腺素、前列腺素和血栓素)。有大量证据表明前列腺素 E_2 (PGE_2) 是花生四烯酸的主要代谢产物,能提高下丘脑的体温调节节点至发热水平。发热时,脑脊液中的 PGE_2 含量增高,阿司匹林和其他退热剂的药理作用与它们阻断大脑中环氧化酶的作用直接相关。新的体温调节信号传输到神经系统,使之刺激外周血管而发生收缩,以保存体内的热量,于是身体就会打寒战,这种不适感会激活身体里其他生理机能从而产生更多热量,使身体达到一种自身平衡,最终变为发热^[18,24]。

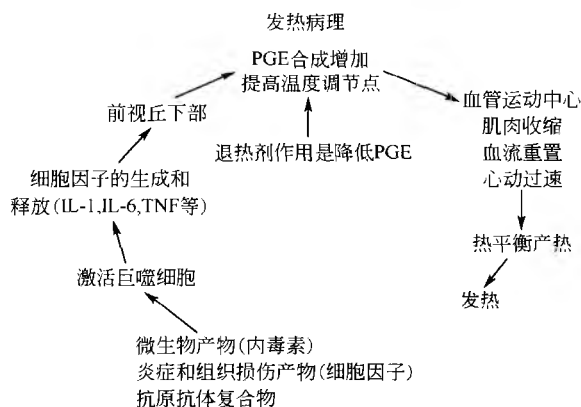


图3 导致人和动物发热的系列事件

国立卫生研究院在研究论文中描述了人体对于阈剂量内毒素所产生的全身反应。将 USP 内毒素参考标准(埃希氏大肠杆菌 0113 : H10 : K0)以 $2\sim 4\text{ ng/kg}$ 的剂量注射于健康志愿者体内^[25], 大约 1h 后出现升温, 同时伴有寒战和身体僵硬, 寒战持续了 $15\sim 30\text{ min}$, 之后 2h 内有不同程度的肌痛、关节痛、头痛和恶心。在此期间, 受试者脸色蜡黄, 还表现出常见的不适。在注射后 3h, 体温达到最高峰 ($38.5\sim 40.0^\circ\text{C}$), 之后 $3\sim 5\text{ h}$ 内体温下降, 症状也有所改善。

4.2 败血性休克

如前所述, 细菌内毒素引起了制药企业的关注, 因静脉注射量低至 1 ng/kg 时即可产生发热反应。注射较大剂量则可致命。一篇报道中, 一名中年试验室工作人员自己静脉注射了 1 mg 沙门氏细菌内毒素, 引发了败血性休克综合

征的全部临床表现^[26], 出现了高心脏输出型的低血压、弥漫性血管内凝血、肝肾功能异常和非心源性肺水肿。这位患者得到了及时的诊断和治疗从而幸免于难。

4.3 内毒素在生物学方面的益处

肿瘤的缩小可归功于内毒素^[27]。内毒素对宿主免疫系统的其他益处还包括增强免疫防护功能, 使其免受致命性辐照的伤害, 增强对感染的非特异性抵抗力, 以及对中毒剂量内毒素的抵抗力(耐受性)。研究者曾提出一个假设, 以解释内毒素所表现出来的看似矛盾的两方面作用^[28]: 有毒和有益。假设提示了这些反应是动物体用来探测 GNB 的潜在危害的最初信号, 宿主免疫系统调用多种免疫物质来探测细菌感染并作出相应反应。假设还提出, 机体具有反馈机制, 多数情况下, 机体将作出适当的反应以对抗细菌内毒素的威胁, 反应强度进展到使保护作用最大化, 而使机体的生物消耗和自体损伤减至最小。总之, 这些反应的益处远大于危险性。如果确有有害事件发生, 则是机体防御系统过度反应所表现出来的不适行为^[28]。

5. 内毒素的物理特性

了解内毒素在物理学方面的多种特性非常重要, 这样就可理解当它处于不同环境中时为何改变其行为, 还可为设计有效去除热原的方法提供依据。

5.1 热稳定性

很早以前, 研究者就了解到内毒素在湿热环境中具有热稳定性, 而且常规的高压灭菌法也无法将其破坏。早期的研究显示, 煮沸法不完全有效^[19]。然而, 内毒素在干热环境中当温度达到 180°C 以上时可被破坏。事实上, 干热法即作为去除耐热器具(如玻璃器皿和设备)中热原的首选方法。

5.2 内毒素的大小

内毒素的大小取决于其聚集状态, 而后者又取决于其周围环境。在水溶性环境中, 脂多糖排列成双分子层, 其中疏水的脂质 A 聚集在双分子层内部, 而亲水的成分则向外暴露于溶液中。二价阳离子可使细菌脂多糖更稳定。当镁、钙离子存在时, 脂多糖可形成一片双分子层和直径达 100 nm 的囊泡^[21]。然而当二价阳离子被除去后, 双分子层将分解成 $20\sim 70\text{ nm}$ 长、 $3\sim 7\text{ nm}$ 厚的微囊。当加入清洁剂后, 这些微囊将进一步分解成直径为 $0.8\sim 1.2\text{ nm}$ 、长度为 $10\sim 60\text{ nm}$ 的亚单位。

由于脂多糖分子中疏水基团之间的吸引作用, 内毒素在水溶液中聚集得越来越大。直径达 0.1 mm 的内毒素聚集囊泡可在电子显微镜下检视到。即使最大的内毒素聚集体也可以通过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的除菌过滤器。孔径为 1.0 nm 的常规反渗透膜可将内毒素从水中除去^[29]。这一过程也将除去可能存在的盐离子。

5.3 分子质量

在典型的含有少量二价阳离子的水溶液中,内毒素的分子质量约为 10^6 Da^[21]。如果二价阳离子被螯合剂结合掉,内毒素双分子层则分解成分子质量为 30 万~100 万 Da 的微囊。当表面活性剂存在时,这些微囊进一步分解,分子质量跌至 1 万~2 万 Da。但以上过程均是可逆的。如果用透析法除去清洁剂,重新加入二价阳离子,内毒素又会重新组装成微囊然后再形成双分子膜^[30]。

随着水中盐浓度的增加,内毒素形成的聚集物也越来越大,它的聚集状态同时影响它的溶解性和生物反应。当内毒素的分子质量增加时,它的水溶性降低,而对大鼠的毒性、血中清除率、与补体的相互作用以及对细胞的亲和力均增加。然而,随着分子质量的增加,对家兔的致热性降低,对小鼠的致死性也降低^[31]。

5.4 静电特性

在 pH>2 的环境中,内毒素聚集物带负电荷而表现为阴离子^[21]。这一特性解释了内毒素聚合物在溶液中为何可以吸引二价阳离子,也为用带正电的吸附剂去除内毒素提供了依据。

热原试验

大输液制药工业的发展提示人们,需要进行热原检查试验,以保证药品的安全性。热原污染问题对于大输液生产者比小容量注射剂生产者更为重要,因为胃肠道外给药引起的患者发热,与剂量的相关性大于与浓度的相关性。换句话说,注射发热的发生及其程度取决于进入患者体内的热原总量,而不是每毫升药物中热原的浓度。因此,大输液在无热原方面应比小容量注射剂符合更严格的标准。

一方面第二次世界大战前及期间大输液大量使用,另一方面为了确保工厂生产销售的输液内不含热原,USP 建立了一种检测热原的法定试验^[32]。1941 年,USP 修订委员会授权第 3 小组委员会以生物测定法开始 USP 最早的对热原的合作研究。使用假单胞菌的滤液作为研究对象,滤液由 FDA 细菌学部制备提供。这项研究由 FDA、NIH 和 14 家药厂共同承担^[33,34]。研究采用了家兔热原试验,这一试验曾被 Hort、Penfold、Seibert 和他们的合作者使用过^[7~9]。大量的家兔被注射了发热物质和生理盐水。该项研究的成果(1943 年发表)使在 1942 年出版的第 12 版 USP 首次收录了法定的热原试验方法。尽管一次一次地修订,但 USP 中家兔热原法基本保持原有内容。

热原试验的主要内容是,经家兔耳缘静脉注射供试溶液,于注射前后分别测定家兔的直肠温度,如果动物出现发热反应且升温超过已确定的限值,该溶液则被判定为可致热。家兔之所以被选中用于热原试验,是因为价格较便宜,易于处置,而且具有多变的体温调节机制。家兔经常发生假阳性反应,因此阴性结果比阳性结果更具意义,所

以要确定供试溶液中无热原,使用家兔试验是很好的选择^[32]。

1969 年,Greisman 和 Hornick 用家兔和健康成年男性进行试验,比较了三种内毒素纯化物的致热性^[35]。结果显示,导致家兔与人产生发热反应的内毒素阈剂量(以单位体重剂量计)大致相同。

1. USP 家兔热原试验

USP 附录〈151〉热原试验^[36]适用于注射液,在注射容量不超过 10mL/kg 时,家兔可耐受,而且能够在 10min 的规定时间内注射完毕。与上述规定不同之处可见 USP 产品各论或生物制品的联邦规定。有关热原试验所用器具的处理、记录仪器校准限的具体规定,以及有关家兔饲养环境、如何使之适应试验环境的规定均见 USP〈151〉中相关章节。

首次热原试验,应选择健康成年家兔,每 3 只一组。选取精确的感温装置,如温度计或热感应探头,将其插入家兔直肠以记录体温。如果整个试验过程均需要将探头插在直肠内,就要用松紧合适的颈部装置限制家兔,但允许其走动。在试验过程中,应对家兔禁食但不禁水。

在注射药物前 30min 内测定基础体温。试验溶液在注射前需温热至 $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。注射完毕后,每隔 30min 记录一次家兔体温,连续记录 3h。体温降低视为升高 0°C 。如果没有 1 只家兔体温较基础体温升高 0.5°C 或 0.5°C 以上,则判定供试品符合无热原的规定。如果任何 1 只家兔升温 0.5°C 或 0.5°C 以上,则另取 5 只家兔进行复试。初复试 8 只家兔中,如果升温 0.5°C 或 0.5°C 以上的家兔不超过 3 只,且 8 只家兔升温总和不超过 3.3°C ,则判定供试品符合 USP〈151〉关于无热原的规定^[36]。

2. 人细胞热原试验

如前所述,外源性热原可诱使人体单核细胞释放细胞因子如 IL-1、IL-6、IL-8、和 TNF- α 。基于此原理,有研究者设计试验,将供试品与人全血中的单核细胞或培养的单核细胞株共同孵育一定时间,然后分析测定某种细胞因子的含量。这种基于细胞的方法可为人血液制品的热原试验提供一种家兔试验外的选择方法。目前,还需进一步的研究以确定哪种细胞因子最适宜分析,并对分析中的干扰条件予以评价^[37,38]。

细菌内毒素试验

美洲鲎血变形细胞溶解物试剂(鲎试剂, LAL)是体外热原试验的主要成分,该方法对细菌内毒素热原具有特异性。因此,该试验现在被称为细菌内毒素试验(BET),而 BET 和 LAL 试验是同一概念。这一方法刚被引进时,企业和管理当局曾担心它的特异性会限制它在注射剂生产厂家的应用^[39]。然而,25 年的经验积累确定了内毒素是药品和医疗器械厂商所关心的最主要热原物质。就这样,

BET 顺理成章地得到了全世界的认可，从而逐步取代家兔热原试验。

1. 鲎试剂的发现

鲎试剂是通过溶解美洲马蹄蟹（即鲎）血液中变形细胞而制备的。鲎试剂的起源要追溯到 Frederick Bang，他在 Woods Hole 的海洋生物学实验室研究海洋生物体时，是他最早验证了细菌内毒素和鲎血凝结之间的关联性。由于在免疫性和感染性疾病方面的兴趣，促使他研究鲎对注射细菌会产生怎样的反应。他观察到革兰氏阴性弧菌（一种 S 形霍乱菌）和从中提取的内毒素可致鲎死亡，死因并非感染而是血管内凝结^[40]。

Jack Levin 对细菌内毒素在血小板和人血液凝结方面的作用很感兴趣，并且加入到 Bang 的实验室，连续几个夏天致力于研究内毒素引发的鲎血液凝结。他们通过协作，发表了几篇论文，解释了鲎试剂和内毒素之间由酶介导的相互作用的简单机制^[41,42]。Levin 发现了一种利用渗透性溶解变形细胞来获取细胞内液的方法。如今，鲎试剂的制备仍然沿用了 Levin 的基本方法。

Levin 对于鲎试验的最初兴趣在于将它作为内毒素血症的临床诊断工具。然而 Levin 和 Cooper 的协作却使鲎试验产生了最著名的应用：作为热原试验广泛应用于注射剂生产企业。随着 19 世纪 60 年代短效放射活性药物的出现，需要一种快速热原试验，且只需少量受试溶液。Cooper 在寻找可供选择的内毒素试验时，比较了鲎试剂的灵敏度和家兔的反应。家兔发热阈剂量以埃希氏菌和克雷白菌的 LPS 的量表示。结果发现，家兔发热反应（发热指数）与鲎试剂反应（凝胶时间）之间具有极好的相关性，说明体外试验确实是生物反应的指示器^[43]。鲎试验表现出相当好的灵敏度和重现性。

Cooper 和 Mills 于 1971 年在 Chincoteague 创立了第一个鲎试剂商品生产基地，隶属于 Mallinckrodt 公司（图 4）。鲎试剂的生产场所位于美国东海岸，那里的浅海水域有丰富的马蹄蟹资源。鲎试验之所以成功地成为第一个动物试验的替代试验，在于鲎和哺乳动物对内毒素产生的反应是如此惊人的相似^[44]。人血液单核细胞被内毒素激活后分泌前致炎细胞因子，鲎变形细胞被内毒素激活产生凝结酶，两者的可比性极强。由于鲎试剂的商业化供应，制药企业开始研究用鲎试验取代家兔热原试验。

2. 鲎试剂凝结反应原理

鲎试验是基于原始的凝血防护机理，这一机理使得马蹄蟹受到保护，免遭海水中的革兰氏阴性菌的侵袭。马蹄蟹受伤时，细菌侵入它的血液，血液中的变形细胞即释放出含有胶原蛋白的颗粒，内毒素激活了细胞内丝氨酸酶原，从而引发一系列的活化作用，以至于使胶原蛋白形成凝固蛋白胶状凝块。在整个凝结反应过程中，C 因子、B 因子和凝固酶的相继活化使得鲎试剂对内毒素的反应灵敏度大大提高。图 5 显示了 Nakamura 提出的凝结过程^[45]。



图 4 马蹄蟹被置于一个控制架上，放血数分钟，然后被迅速放回大海，继续生存。血中变形细胞被浓缩、洗涤，然后溶解制成鲎试剂
(图片提供者：J. Cooper, Endosafe, Charleston, S C)

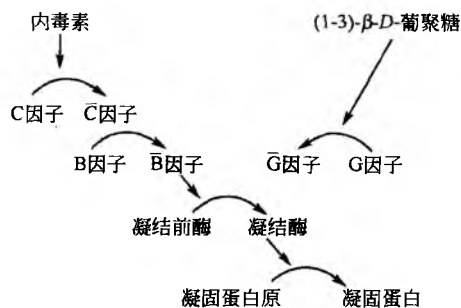


图 5 鲎血变形细胞凝结过程

马蹄蟹还可能受到霉菌和酵母菌的侵袭，这就解释了为何 G 因子可对 (1-3)-β-D-葡聚糖（上述微生物细胞壁中的成分）产生响应。这一反应途径使得鲎试剂凝结系统产生非内毒素活化作用^[46]。

3. 细菌内毒素试验方法

在内毒素检测中观察试管中凝胶形成情况的方法，为试验提供了简便的手段。在实际应用中，需要更加客观的定量测定，于是科学家们又设计了多种多样的内毒素自动测定方法。本章仅论述被美国 FDA 认可的三种方法。

3.1 凝胶法

凝胶终点法是应用最普遍的内毒素试验。它操作简便，所需的实验室设备和工具最少。在 10mm×75mm 的玻璃试管中，将等量的试验溶液与鲎试剂（通常均为 0.1mL）混



合,于37℃孵育1h,然后缓慢颠倒试管观察其中凝胶的形成情况。当试管中形成固体凝胶时,即使试管颠倒凝胶也不脱落,结果为阳性。每一批得到FDA许可的凝胶试剂,必须标明相对于内毒素参比标准品(RSE)的灵敏度(λ)。该试验可用于定性控制,以判断在某一鲎试剂灵敏度下样品是阳性或是阴性,所以该试验被称为限度试验。该试验还可用于半定量法滴定阳性样品的反应终点浓度,将阳性样品稀释液浓度乘以标示灵敏度。

3.2 动态浊度法

在鲎试剂与内毒素反应过程中,混合溶液变得越来越浑浊。使用动态浊度法(KTA)需要一台孵育微孔板或试管的阅读器,同时要有内毒素专用的驱动程序。在KTA系统中,反应混合物的光密度变化受到持续的监控,该光密度的变化由光的散射和吸收引起。一般来说,KTA方法需测定每一份反应混合物达到预设吸收度所需的时间,并将样品反应时间与内毒素标准品的反应时间比较,从而得出样品或样品对照中内毒素含量。

3.3 动态和终点显色法

与上述试验不同,显色法鲎试验并非利用鲎试剂中的胶原蛋白达到终点。在此方法中,内毒素能激活鲎试剂中与上述相同的酶系列,不同之处在于与凝固酶发生反应的是预先加入的合成底物。底物由发色基团和不显色的氨基酸链组成。活化的凝固酶可切断发色基团与氨基酸之间的化学键;发色基团的释放量与内毒素的浓度成一定比例^[47]。发色基团使反应混合物颜色变化,光密度增加。在动态显色法(KCA)中,使用与KTA相同的方法和阅读器测定反应混合物的反应时间。终点显色法可使用无孵育功能阅读器(如分光光度计),此方法需依次加入鲎试剂、反应底物和反应终止剂。反应终止后,反应混合物的吸收值在一个对数单位范围内变化即可被测定。相比之下,动态浊度法和动态显色法可测定2~4个对数单位范围内的变化。

4. 细菌内毒素试验的法定和法规情况

随着对鲎试验检测能力信心的增加,又因为鲎试验可作为内毒素热原的筛选工具,制药企业和医疗器械企业纷纷以这一新的体外试验替代原有的家兔试验。在这种形势下,USP不断修订细菌内毒素试验,以便与鲎试验方法学新进展保持同步。

5. USP〈85〉细菌内毒素试验

1980年,细菌内毒素试验以一章的形式第一次被收载在USP第20版中。令人注目的是,USP采用FDA的*E. coli* 0113内毒素标准作为参比标准品,并标明了效价单位^[48]。报道中还论述了以参考标准校准工作标准品(CSE)的方法。

第一次从家兔试验向内毒素试验的大范围转换是在

USP第22版第5增补本颁布时,此时有185个USP品种的内毒素试验已成为正式试验。到USP第24版,已有超过650个品种制订了内毒素限度。

5.1 内毒素限度

这一概念是由FDA引入的,以确保注射用药物中内毒素含量在安全线以下。由于内毒素在自然界普遍存在,因此有必要确定允许的、安全的限值,该限值应低于能引起发热反应的内毒素阈值。1983年,USP正式将29种放射性药品和5种制药用水的热原试验替换成USP〈151〉内毒素试验。1987年,负责修订通则的小组委员会宣布,将把所有USP品种的热原试验替换为内毒素试验,当然替换为内毒素试验需进行验证^[48]。运用FDA设计的公式 K/M 为USP品种确定内毒素限度。 K 为人类可耐受的内毒素限值,设定为5EU/kg, M 定义为每小时每公斤体重给予的最大供试品剂量。最大剂量可从注射剂的产品标签上获得。如果某种物质的给予剂量以质量计,它的内毒素限值以EU/mg或单位表示,如小容量注射剂。大输液和医疗器械提取液的内毒素限值为0.5EU/mL。以容量表示给药剂量的药物内毒素限值以EU/mL表示。

5.2 鞘内用注射剂内毒素限度

鞘内用制剂将注射药物直接注入脑脊液腔隙。这类制剂的内毒素允许值 K 为0.2EU/kg,因为通过这一途径内毒素热原引起的毒性反应最强。曾有患者脊柱内注射核造影剂后发生了无菌性脑膜炎,所使用的造影剂被内毒素污染,但此造影剂经热原试验却是合格的^[49]。其中所含内毒素少于10EU/剂的1mL药物可引起患者严重的反应,这一现象提示了鞘内用注射剂需要更严格的内毒素限度。

5.3 协调化内毒素试验

关于USP〈85〉细菌内毒素试验的协调化文本于2001年1月生效^[50],它由国际协调组织(ICH)颁布。这篇文本由日本药典会起草,由欧洲药典会和美国药典会同意。USP采纳了这篇文本,在有关章节中引入了一些基本性的修改。该文本被简化以便易于理解和遵循。以前的版本只收载凝胶法,新版本提供了标准化的凝胶法和光度法鲎试验。任何验证过的方法均可用于USP品种,但当发生争议时,仍以凝胶法作为仲裁方法。

6. FDA 鲎试验验证指南

FDA积极地参与细菌内毒素试验替代热原试验。1972年,Cooper和FDA生物制品署(现为生物制品评价和研究中心)共同协作,在FDA内创立了鲎试验方法学。一项以生物制品和放射性药物为研究对象,就鲎试验和家兔试验进行比较的研究显示:鲎试验是适用于以上两种药物的一种快速、灵敏和可重现的热原检测方法^[51]。1973年,联邦注册局宣布了FDA打算批准鲎试剂为生物制品。这一公示亦显示出鲎试剂检测内毒素的使用价值^[52]。

R

联邦注册局于 1977 年发布了一项公示, 对用于检测医疗器械和生物制剂的内毒素试验作为放行试验给予有条件的批准, 规定生产商要向各有关部门递交试验验证数据, 以修正产品的注册文件或许可证^[53]。医疗器械署确立了自己的内毒素标准, 而且支持企业的协作研究以制定内毒素限值, 同时统一胃肠道外器械的试验方法。面对鲎试验被广泛接受, FDA 决定起草一个单独的指南, 适用于各部门管辖的、需经内毒素检查的制品。一个由来自各部门不同中心的代表组成的 FDA 专项工作组成立了, 目的在于统一试验验证标准。1987 年, 出版了成品的鲎试验指南^[54]。

FDA 的鲎试验验证指南描述了如何运用各种鲎试验方法, 并要确定符合以下三个基本规定:

(1) 用于所有验证试验、各个操作步骤和成品试验的鲎试剂必须得到 CBER 的许可;

(2) 产品制造商必须对实验室的人员和设施进行最初的资格审定;

(3) 供试品必须进行抑制和增强试验, 以确定其不干扰内毒素的检测。

这部指南是迄今为止关于鲎试验的最有影响力的文件。从指南颁布到 1994 年的每一年中, FDA 都要发表关于附录 E 的补充资料, 其中规定了已经试验确定的注射剂品种的内毒素限值。随着试验步骤的改良和每个品种内毒素限值的公布, FDA 不再需要修订 1987 年的指南。

7. 抑制和增强作用的克服

LAL 与内毒素的反应需要的条件为 pH 中性, 钠离子和二价阳离子的浓度要优化。37℃ 的温度能优化反应速度。大多数治疗药物在测试前要用 LAL 试剂水 (LRW) 稀释以避免干扰, 该干扰可通过阳性对照品 (PPC) 的回收率偏差加以证实。抑制是 PPC 回收率低, 增强是 PPC 回收率偏高。Cooper 介绍了确定物质浓度的方法, 要与 BET 化学相容, 并用药品和辅料加以验证^[55]。

7.1 抑制机理

在凝胶法-动态 LAL 测试中, 有三个主要的抑制机制^[55]: 首先是化学副反应, 如非中性的 pH, 钠离子和二价阳离子 (钙和镁) 的浓度未优化, 三价阳离子如可溶性的铝和钒离子的抑制。LAL 生产商可通过在处方中采用所有必需组分的最优浓度, 特别是足量的有机缓冲液, 来减轻这些问题。其次, 重要的抑制是没有用纯的内毒素作为 PPC, 这种状态有时是人为的, 因为纯的内毒素 LPS 在水中的稳定性不如天然的内毒素, 后者有稳定蛋白接在上面。这种不稳定性会引起容器的吸附和分子的聚集, 使得 LAL 检测的阳性对照不可靠, 通过旋涡振荡不一定能解决这个问题。供应商对 CSE 的处方优化对于阳性对照的回收率很关键。最后, 不恰当地控制测试参数如试验附件、试剂和分析员的熟练程度也会干扰结果。

7.2 增强

一般来说, 鲎试剂反应具有内毒素特异性, 但葡聚糖

是个例外。(1→3)-β-D-葡聚糖来源于纤维素、酵母和其他特定的微生物, 它能像内毒素一样激活鲎试剂, 因此在动态鲎试验中它可以对 PPC 产生协同增强作用。对于含有葡聚糖的产品, 细菌内毒素试验允许采用处理过的鲎试剂进行试验, 使试剂对内毒素具有特异性, 从而避免假阳性的出现。

7.3 样品阳性对照 (PPC) 的制备

FDA 制定的指南中规定必须设置 PPC。PPC 是含有一定浓度内毒素的样品溶液, 其中内毒素的浓度为鲎试剂标示灵敏度的两倍^[54]。每种样品在进行限度试验或动态定量分析前必须用 PPC 进行试验, 以确保上述两种试验不受干扰、结果有效。最精确、可靠的技术是“加样”法, 即在加入鲎试剂前于反应容器 (试管或孔) 中加入 10μL 内毒素标准品溶液。凝胶法需加入 10μL 20λ 的内毒素标准品溶液, 动态法需加入 10μL 10 倍于干扰浓度的内毒素标准品溶液, 这些试管或孔即成为 PPC。凝胶限度法仅能观察到抑制作用, 而动态法能观察到抑制和增强两种作用。

7.4 细菌内毒素试验的灵敏度

中间体溶液、散装原料和成品注射剂的内毒素试验结果用相同的单位表示。有两个因素决定了内毒素试验的灵敏度。对于输液和器械提取液, 一个是凝胶法试剂的灵敏度或动态法标准曲线的最低点 (动态法鲎试剂的 λ), 另一个是溶液的稀释度^[55]。对于内毒素限值以 EU/mg 表示的成品, λ 和供试品浓度的选择决定了试验的灵敏度。产品特异性灵敏度 (PSS) 计算公式, 是求出这类产品内毒素试验灵敏度的简便方法:

$$PSS = \frac{\lambda / (EU/mL)}{\text{测试浓度} / (mg/mL)}$$

去热原

除去或破坏溶液中、物质表面的内毒素的过程被称为“去热原”。内毒素很难被清除, 因为它在自然界无处不在, 性质稳定, 且能通过除菌过滤器。化学法去热原需用强碱或强氧化剂进行处理, 这些试剂具有很强的腐蚀性。注射剂在无菌过滤或混合前, 所有成分包括赋形剂和活性组分都必须去热原^[55,56]。可以用内毒素试验来监控去热原的有效性。

1. 水

城市供水通常含有 5~50EU/mL 的内毒素。要通过超滤、蒸馏或反渗透方法来分离去除水中的内毒素, 这样才能作为制药用水^[55]。水处理系统中内毒素的主要来源是细菌, 它以生物膜或克隆的形式被吸附在树脂床中。如果没有动态的清洁卫生程序, 水处理系统就会被污染。注射用水的内毒素限值设定为 0.25EU/mL, 因为它是一种重要的溶媒, 也是热原的主要来源。

2. 玻璃器皿

干热灭菌法适用于玻璃器皿和其他耐热原料的去热原^[55,57]。温度达到 250~325℃ 时,可迅速杀灭内毒素。烘箱中装载物品的尺寸和质量可影响内部温度达到平衡所需的时间,因此需证实采用一些经验数据能达到所需的条件。通常采用过度杀灭循环以达到 4~6 个对数减灭值 (LRV)。于 250℃ 加热至少 30min,可获得大于 3 个 LRV 的效果。

烘箱循环是否有效可用挑战试验进行验证,在 5~10mL 的玻璃瓶中加入 1000~10 000EU/瓶的内毒素,其中含有指示剂。玻璃瓶的结构可以旋涡混悬,能获得完全的回收率。将这些瓶子置于烘箱中,模拟高温消毒过程,然后分析测定 LRV。

3. 橡胶塞

橡胶塞的传统灭菌、去热原方法包括洗涤、清洗和蒸汽灭菌三步。该三步法可有效减少内毒素,在验证程序要加以考虑。蒸汽灭菌作为去热原方法尚未得到认可^[58]。三步联合法可持续获得 3 个 LRV 的效果。橡胶塞挑战试验的回收率小于玻璃器皿的回收率,因为橡胶塞多孔易渗水,而且不能很好地旋涡混悬。橡胶塞挑战试验的回收率应大于 10%^[55]。

4. 原料药

热原反应的爆发,强调了规定内毒素警戒线 (EAL) 的必要性,从而要防止血液和发酵产品被内毒素污染。曾经发生的两起热原反应事件,都向上追踪到一家良他霉素原料药制造商^[59]。引起患者发热的内毒素值,接近于内毒素参比标准品的发热阈剂量 4.1EU/kg,该值是用参比标准品在健康男性志愿者身上研究确定的^[60]。

原料药的 EAL 是成品内毒素限值 (EL) 的分数值。比较恰当的 EAL 值为不大于 EL 的 1/4~1/5,具体数值要视原料药的溶解性和干扰特性而定。经验证确认的原料药内毒素检查方法应包括如何溶解、稀释药物,以及稀释到多少浓度才适合内毒素试验^[55]。

生物制品

要消除基因重组产品或发酵产品中的内毒素具有相当的难度,因为生产所使用的宿主微生物会产生大量的内毒素而混入原料药。这类产品通常采用分子亲和柱来分离去除内毒素和喂饲营养物等杂质。

5. 细菌内毒素试验的发展前景

在制药和医疗器械企业中,凝胶试验正逐步被动态鲎试验替代以量化试验结果,从而增强了试验效能,内毒素试验数据的管理也趋于完善。强大的动态内毒素法专用软件建议,需要有简洁的方法、易于理解的报告、趋势分析,以及与软件中的验证规定相符。在过去的 25 年中,细菌内毒素试验使注射剂行业大大减少了其产品中的内毒素热原。

Bait 渔业和鲎试剂制造业之间对鲎的竞争,导致了沿海保护措施的产生,用以维护鲎资源。细菌内毒素试验将继续作为基本的检测工具,以保障注射剂的使用安全性。

参考文献

1. Annen, G. I. I. An Exhibition of Books on the Growth of Our Knowledge of Blood Transfusion. Bull. N. Y. Acad. Med. 1939, 15, 622-632.
- 1b. Dudrick, S. J.; Rhoades, J. E. JAMA 1971, 215, 923-949.
2. Macht, S. D. Three Hundred Years of Parenteral Nutrition: The History of Intravenous Nutritional Therapy. Conn. Med. 1980, 44 (1), 27-30.
3. Westphal, O.; Wesphal, U.; Sommer, T. The History of Pyrogen Research. Microbiology. 1977, 221-238.
4. Seibert, F. B. Pyrogens from an Historical Viewpoint. Transfusion. 1963, 3, 245-249.
5. Centanni, E. Untersuchungen über Das Infektionsfieber, Das Fiebergift Der Bakterien. Deutsch. Med. Wochenschr. 1894, 10, 148.
6. Hort, E.; Penfold, W. J. Microorganisms and Their Relation to Fever. J. Hyg. Camb. 1912, 12, 361-390.
7. Hort, E.; Penfold, W. J. A Critical Study of Experimental Fever. Proc. Roy. Soc. Med., London, Ser. B. 1912, 85, 174-186.
8. Hort, E.; Penfold, W. J. The Reaction of Salvarsan Fever to Other Forms of Injection Fever. Proc. Roy. Soc. Med., Part III, Pathology. 1912, 5, 131-139.
9. Seibert, F. B. Fever-Producing Substances Found in Some Distilled Waters. Am. J. Physiol. 1923, 67, 90-104.
10. Seibert, F. B. The Cause of Many Febrile Reactions Following Intravenous Injections. Am. J. Physiol. 1925, 71, 621-651.
11. Seibert, F. B.; Mendel, L. B. Temperature Variations in Rabbits. Am. J. Physiol. 1923, 67, 83-89.
12. Pearson, F. C., III Pyrogens Other than Endotoxin. Pyrogens; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1985; 64-76.
13. Dinarello, C. A. Production of Endogenous Pyrogen. FASEB. 1979, 38, 52-56.
14. Elin, R. J.; Wolff, S. M.; McAdam, K. P. W. J.; Chedid, L.; Audibert, F.; Bernard, C.; Oberling, F. Properties of Reference Escherichia Coli Endotoxin and Its Phthalylated Derivative in Humans. J. Infect. Dis. 1981, 144, 329-336.
15. Marcus, S.; Anselmo, C.; Luke, J. Studies on Bacterial Pyrogenicity, II. A Bacteriological Test for Pyrogens in Parenteral Solutions. J. Am. Pharm. Assoc. 1960, 9, 616-619.

16. Atkins, A.; Freedman, L. R. Studies in Staphylococcal Fever, I. Responses to Bacterial Cells. *Yale J. Bio. Med.* 1963, 35, 451—471.
17. Braude, A. I.; McConnell, J.; Douglas, H. Fever from Pathogenic Fungi. *J. Clin. Invest.* 1960, 39, 1266—1276.
18. Atkins, E. Pathogenesis of Fever. *Physiol. Rev.* 1960, 40, 580—605.
19. Dinarello, C. A. Interleukin-1 and Its Biologically Related Cytokines. *Adv. Immunol.* 1989, 44, 155—205.
20. Bendtzen, K. Interleukin-1, Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor in Infection, Inflammation and Immunity. *Immunol. Lett.* 1988, 19, 183—192.
21. Pearson, F. C., III Endotoxin. *Pyrogens*; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1985; 23—56.
22. Rietschel, E. T.; Brade, H. Bacterial Endotoxins. *Sci. Am.* 1992 (August), 55—61.
23. Rietschel, E. T. Foreword. *Immunobiol.* 1993, 187, 167—168.
24. Hellon, R.; Townsend, Y. Mechanisms of Fever. *Pharm. Ther.* 1983, 19, 211—244.
25. Martich, G. D.; Boujoukos, A. J.; Suffredini, A. F. Response of Man to Endotoxin. *Immunobiology.* 1993, 187, 403—416.
26. Taveira da Silva, A. M.; Kaulbach, H. C.; Chuidian, F. S.; Lambert, D. R.; Suffredini, A. F.; Danner, R. L. Brief Report: Shock and Multiple-Organ Dysfunction After Self-Administration Of Salmonella Endotoxin. *New Eng. J. Med.* 1993, 328, 1457—1460.
27. Naunts, H. C. Bacterial Pyrogens; Beneficial Effects on Cancer Patients. *Biomedical Thermology*; Alan R. Liss, Inc.: New York, 1982; 687—696.
28. Legrand, E. K. An Evolutionary Perspective of Endotoxin; A Signal for a Well-Adapted Defense System. *Med. Hypoth.* 1990, 33, 49—56.
29. Nelson, L. Application of Reverse Osmosis in Pyrogen Removal. *Depyrogenation, Technical Report No. 7*; Parenteral Drug Association; Philadelphia, 1985; 28—36.
30. Sweadner, K. J.; Forte, M.; Nelson, L. Filtration Removal of Endotoxin (Pyrogens) in Solution in Different States of Aggregation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1977, 34, 382—385.
31. Galanos, C.; Freudenberg, M. A.; Luderitz, O.; Rietschel, E. T.; Westphal, O. Chemical, Physicochemical and Biological Properties of Bacterial Lipopolysaccharides. *Biomedical Applications of the Horseshoe Crab (Limulidae)*; Cohen, E., Ed.; Alan R. Liss; New York, 1979; 32—332.
32. Weary, M. The Rabbit Pyrogen Test. *Pyrogens*; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1985; 104—118.
33. Welch, H.; Calvery, H. D.; McClosky, W. T.; Price, C. W. Method of Preparation and Test for Bacterial Pyrogens. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1943, 32, 65—69.
34. McClosky, W. T.; Price, C. W.; Van Winkle, W. J.; Welch, H.; Calvery, H. O. Results of First USP Collaborative Study of Pyrogens. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1943, 32, 69—73.
35. Greisman, S. E.; Hornick, R. B. Comparative Pyrogenic Reactivity of Rabbit and Man to Bacterial Endotoxin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1969, 131, 1154—1158.
36. <151> Pyrogen Test. *U. S. Pharmacopeia 24*; United States Pharmacopeial Convention, Inc.; Rockville, MD, 2000; 1850.
37. Taktak, Y. S.; Selkirk, S.; Bristow, A. F.; Carpenter, A.; Ball, C.; Rafferty, B.; Poole, S. Assay of Pyrogens by Interleukin-6 Release from Monocytic Cell Lines. *Pharm. Pharmacol.* 1991, 43, 578—582.
38. Dinarello, C. A.; Gatti, S.; Barfai, T. Fever: Links with an Ancient Receptor. *Curr. Biol.* 1999, 9, R147—150.
39. Pearson, F. C.; Weary, M. The Significance of Limulus Amebocyte Lysate Test Specificity on the Pyrogen Evaluation of Parenteral Drugs. *J. Parenter. Drug Assoc.* 1980, 34, 103—108.
40. Bang, F. B. A Bacterial Disease Of Limulus Polyphemus. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 1956, 98 (3), 325—351.
41. Levin, J.; Bang, F. B. The Role of Endotoxin in the Extracellular Coagulation Of Limulus Blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 1964, 115 (3), 265—274.
42. Levin, J.; Bang, F. B. Clottable Protein In Limulus; Its Localization and Kinetics of Its Coagulation by Endotoxin. *Thromb. Diathes. Haemorrh.* 1968, 19, 1186—1197.
43. Cooper, J. F.; Levin, J.; Wagner, H. N., Jr. Quantitative Comparison of In Vitro (Limulus) and In Vivo (Rabbit) Methods for the Detection of Endotoxin. *J. Lab. Clin. Med.* 1971, 78, 138—148.
44. Flint, O. A Timetable for Replacing, Reducing and Refining Animal Use with the Help of In Vitro Tests: The Limulus Amebocyte Lysate Test (LAL) as an Example. *Alternatives to Animal Testing. New Ways in Biomedical Sciences*; Reinhardt, C. A., Ed.; Weinheim; Germany, 1994; 27—43.
45. Nakamura, T.; Morita, T.; Iwanaga, S. Lipopolysaccharide-Sensitive Serine-Protease Zymogen (Factor C) Found in Limulus Hemocytes. *Eur. J. Biochem.* 1986, 153, 511—521.

46. Cooper, J. F.; Weary, M. E.; Jordan, F. T. The Impact of Non-Endotoxin LAL-Reactive Materials on Limulus Amebocyte Lysate Analyses. *PDA J. of Pharm. Sci. Technol.* 1997, 51, 2—6.
47. Harada, T.; Morita, T.; Iwanaga, S.; Nakamura, S.; Niwa, M. A New Chromogenic Substrate Method for the Assay of Bacterial Endotoxins Using Limulus Hemocyte Lysate. *Biomedical Applications of the Horseshoe Crab (Limulidae)*; Cohen, E., Ed.; Alan R. Liss, Inc.: New York, 1979; 209—220.
48. Weary, M. E. Understanding and Setting Endotoxin Limits. *J. Parenteral Sci. Technol.* 1990, 44, 16—18.
49. Cooper, J. F.; Harbert, J. C. Endotoxin as a Cause of Aseptic Meningitis After Radionuclide Cisternography. *J. Nucl. Med.* 1975, 16, 809—813.
50. 〈85〉 Bacterial Endotoxins Test. USP 24-NF 19; The United States Pharmacopeial Convention, Inc.: Rockville, MD, 2000; 2875—2879, Supplement 2.
51. Cooper, J. F.; Hochstein, D. H.; Seligmann, E. B. The Limulus Test for Endotoxin (Pyrogen) in Radiopharmaceuticals and Biologicals. *Bull. Parent. Drug Assoc.* 1972, 26, 153—162.
52. U. S. Public Health Service. Limulus Amebocyte Lysate: Additional Standards. *Fed. Reg.* 1973, 38, 26130.
53. Dabbah, R.; Ferry, E.; Gunther, D. A.; Hahn, R.; Mazur, P.; Neely, M.; Nicholas, P.; Pierce, J.; Slade, J.; Watson, S. W.; Weary, M. Pyrogenicity of E. Coli 055: B5 by the USP Rabbit Pyrogen Test—HIMA Collaborative Study. *J. Parenter. Drug Assoc.* 1980, 34, 212—216.
54. US Food and Drug Administration. A Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products and Medical Devices; Food and Drug Administration; Rockville, MD, 1987.
55. Cooper, J. F. Bacterial Endotoxins Test. *Microbiology in Pharmaceutical Manufacturing*; Prince, R., Ed.; Parenteral Drug Assoc., Bethesda, Davis Horwood International Publication, Ltd.: Modalmeny, UK, 2001; p. 537—567.
56. Weary, M. Depyrogenation. *Pyrogens*; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1985; 203—218.
57. Tsuji, K.; Harrison, S. Dry Heat Destruction of Lipopolysaccharide; Dry Heat Destruction Kinetics. *Appl. Environ. Microbiol.* 1978, 36, 710—714.
58. Bamba, R.; Matsui, R.; Watabe, I. Effect of Steam-Heat Treatment with/without Divalent Cations of the Inactivation of Lipopolysaccharides from Several Bacterial Species. *PDA J. Parenter. Sci. Technol.* 1996, 50, 129—135.
59. Fanning, M. M.; Wassel, R.; Piazza-Hepp, T. Pyrogenic Reactions Associated with Gentamicin Therapy. *N. Eng. J. Med.* (2000) 343, 1658—1659.
60. Hochstein, H. D.; Fitzgerald, E. A.; McMahon, F. G.; Vargas, R. Properties of US Standard Endotoxin (EC-5) in Human Male Volunteers. *J. Endotoxin Research.* 1994, 1, 52—56.

(黄 卓 译)

R

溶出度和溶出度试验

James L. Ford

Liverpool John Moores University, Liverpool, United Kingdom

Ali R. Rajabi-Siahboomi

Colorcon Limited, Kent, United Kingdom

引言

溶出度试验是评价药物和控制药物制剂质量的最常用的方法之一。在 20 世纪 60 年代后期,人们开始认识到应当通过研究药物从其制剂中溶出的速率来测定溶出数据。随后,USP18 (1969 年)首次收录了 6 个需要进行溶出度试验的品种,到 USP24 则增加到约 600 多个品种,其中也包括了一些缓控释制剂和透皮制剂的释放度试验。

尽管溶出度试验主要是用于质量控制,以保证成品或各批次样品间的一致性,评价药物制剂的优劣,但是溶出度数据也可能与药物的体内活性存在相关性。如果溶出是药物吸收的限速步骤,那么溶出度试验则显得尤为重要。因此,溶出度试验可用于判断药物是否符合其法定标准,同时它也是申请产品注册的必需部分。另外,在产品开发和稳定性试验过程中,溶出度试验也是药物质量标准之一。此外,并不存在通用的溶出度试验,可以为不同品种和批号药物的体外溶出度和体内生物利用度提供同等要求。

溶出度的数学模型

1. 颗粒的溶出

式 (1) 是最早用来描述颗粒溶出过程的表达式之一:

$$\frac{dW}{dt} = \frac{D}{h} S (c_s - c_t) \quad (1)$$

式中: dW/dt 为药物在一定时间 t 内通过一定表面积 S 的速率; $c_s - c_t$ 为已溶出颗粒表面形成的停滞层(厚度 h , 与溶出界面直接相邻)两侧溶质的浓度梯度,假设其等于药物饱和溶液浓度 c_s 与药物在一定时间 t 时周围介质中溶质浓度 c_t 的差值;参数 D 为药物分子的扩散系数的函数。当 $c_t = 0$ 时,溶出速率最快。同样,当 c_t 增加时,溶出速率减慢。参数 D 也与 $c_s - c_t$ 有关。在体内条件下,药物溶出后即被吸收,这种情况被称为漏槽状态(sink condition),如 $c_t < 0.1c_s$ 。在体外,应当尽可能维持这种理想的漏槽条件,药物溶出应该在新鲜溶剂中进行。

在式 (1) 中,参数 D 与温度有关。因此,应当严格控制溶出介质的温度和黏度(也与温度有关)。此外,电解质的存在和 pH 的变化也可能会影响药物的扩散,这是由于离子化发生了变化。这些因素意味着溶出介质应当尽可能简单化。

漏槽条件可以通过多种途径予以强行实现。在有些情况下也会采用非漏槽条件,此时药物溶出不完全,可以选用以下方法加以修正:增加溶出介质的体积;将已溶解的药物从溶出介质的水相中分离出来,使其进入溶出介质上方或下方的有机相中;加入选择性的吸附剂,转移已溶解的药物;向溶出介质中加入容易与水互溶的溶剂,增加药物的溶解性;或者采用流通系统转移已溶解的药物。

2. 单分散相粉末的溶出

多颗粒系统在溶出过程中比表面积减少,这个过程可以用 Hixson 和 Crowell^[1]立方根法则来描述,见式 (2)。

$$W_0^{1/3} - W^{1/3} = Kt \quad (2)$$

式中: W_0 为药物的初始质量; W 为药物在时间 t 时的剩余质量; K 为溶出速率常数。从图 1 中可以看出,在主要的溶出阶段呈典型的直线。立方根法则假设了几个因素,其中包括扩散层厚度为一常数、样品具有各向同性、溶解度与颗粒大小无关、表面光滑程度以及漏槽条件等。对于非漏槽条件和多分散相系统,该方程需要加以修正,如 Lai 和 Carstensen^[2]引入形状因子对立方根法则进行修正。实际上,多分散相系统的溶出需要更加复杂的数学公式来描述。相关问题包括如何正确确定粉末中的颗粒大小的分布,事实上小颗粒比大一点的颗粒具有更好的溶解性,以及考虑溶出过程中颗粒大小和数量的变化。

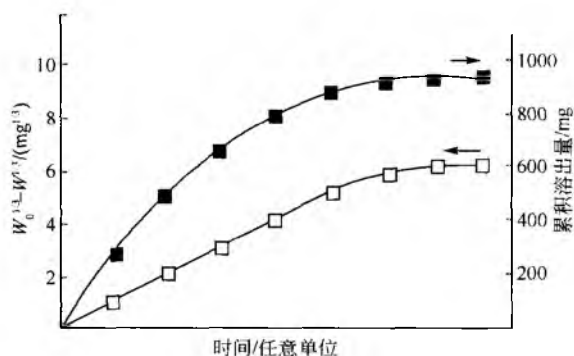


图 1 一个假想固体的溶出数据。右纵坐标为累积溶出量(□);左纵坐标为经立方根法则处理(■)后的数据

3. 崩解型片剂和胶囊剂的溶出

崩解型片剂和胶囊剂的溶出理论发展得相当困难,这是因为崩解使表面积发生了巨大变化。人们已经做了大量尝试,使

用复杂的数学途径,开发描述片剂溶出速率的模型^[3,4]。

4. 非崩解型片剂的溶出

对于从不溶性骨架中高浓度可溶性药物的溶出系统来说, Higuchi^[5] 方程充分描述了其溶出速率, 见式 (3)。

$$\frac{W_t}{t^{1/2}} = 2W_0 \frac{S}{V} (D/\pi\tau)^{1/2} \quad (3)$$

式中, W_t 为药物在时间 t 时的溶出量; W_0 为药物规格剂量; S 为有效扩散面积; V 为水化基体体积; D 为药物在水化基体中的扩散系数; τ 为基体的扭曲率。对于水溶性有限的药物, 也有类似的公式^[6]。

本章的目的不是评价可能会影响药物从其制剂中溶出的制剂方面的因素。然而, 本章中有足够的篇幅叙述了粉末原料或片剂中的溶出速率加快或减慢受多种因素影响, 包括盐的选择、表面活性剂的存在、多晶型修饰, 以及固相分散中使用的水溶性载体等。

确定完溶出的一些重要判据和模型后, 接下来讨论用于测定溶出速率的仪器。

仪器的设计

完美的溶出仪应具有如下特点^[7]:

- 所有零件的制作工艺、尺寸大小和安装位置必须精确指定, 可以实现批与批之间的重现。
- 仪器应设计简单, 易于操作, 并且在各种条件下均能适用。
- 仪器应具有良好的灵敏度, 足以反映工艺条件的变化和制剂间的差异, 但是在相同条件下仍能保持良好的重复性。
- 在大多数情况下, 仪器应能提供强度可调、强度一致且无湍流的液体搅动。流动的一致性是很重要的, 因为水流体动力的变化将改变溶出速率。
- 应能维持近乎理想的漏槽条件。
- 仪器应能提供一种简便方法, 将药物制剂以一种适当可靠的方式投入溶出介质, 并将其保留在仪器中, 直至以常规可靠的形态沉入其中。
- 在实验过程中, 仪器对药物制剂的机械磨损应最小化 (有例外), 避免干扰溶出药物周围的小环境。
- 必须消除溶出介质的蒸发, 并且介质需要维持在一定温度, 温度偏差应符合要求。大多数仪器均以恒温的方式将温度设定在 37℃ 左右。
- 取样时应保持液体流动不中断, 易于取样以便做自动或手动分析。进行手动分析时, 应进行有效的过滤。
- 仪器应适用于崩解型片、非崩解型片、压制片、漂浮片或胶囊剂, 以及粉状药物的评价。
- 仪器应有多个实验室的一致性。

仪器设计有两种基本思路: 第一种是限定介质体积, 受限于操作仪器的大小; 第二种是使用一个连续流动池放置药物, 允许不断补充新鲜介质。

限定溶出介质体积的法定仪器

溶出试验的基本原理就是使粉末或固体制剂在均匀的搅动条件下进行试验, 这可以通过使用仪器内的搅拌器, 或者转动放置药物的容器 (如转篮) 来完成。USP24^[8] 和 BP2000^[9] 均收录了两种主要方法, 用于片剂和胶囊剂的溶出度测定。在仪器 1 中, 药物置于一种转篮中; 在仪器 2 中, 使用一种桨提供搅动。这两种装置均属于限定溶出介质体积型。

1. 篮法

篮法于 1968 年由 Pernarowski 等^[10] 首次提出。使用一种容器, 即放置片剂或胶囊的篮子, 可以更换介质, 其既可用于连续流动模式, 也可用于固定体积模式, 后来逐渐发展为 USP24^[8] 和 BP2000^[9] 收录的 I 法——转篮法, 如图 2 所示。

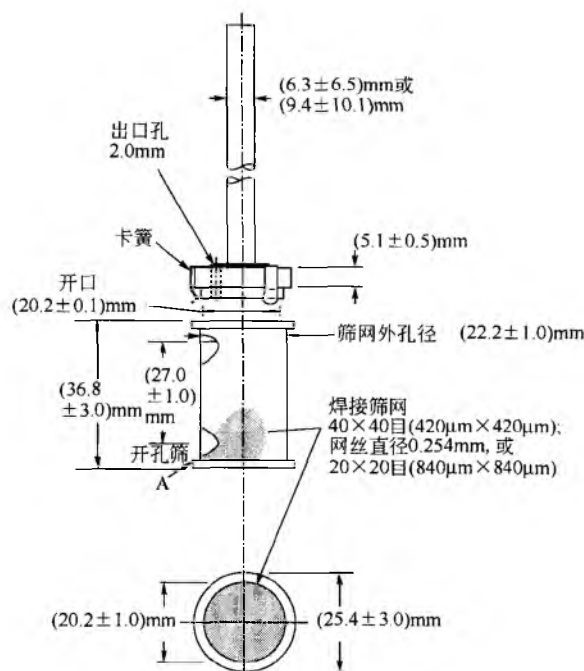


图 2 USP24 收录的篮法示意图

图 2 中的尺寸均取自 USP24, BP2000 与其基本一致。溶出仪由电机、金属转杆、圆柱形篮体以及由玻璃或其他惰性透明材料制成的带有盖子的溶出杯等部分组成。溶出杯的材料应不会对测试样品产生吸附或与其发生反应。溶出介质通常控制在 37℃ ± 0.5℃。除了转动元件的匀速转动外, 不应产生由其他原因引起的明显振动或晃动。此外, 最好能够透过溶出杯观察到转动元件和测试样品。溶出杯为圆柱形, 底部为半球形, 顶部四周带有侧边, 高 160~210mm, 内径为 98~106mm, 常用容积为 1000mL, 也有容积为 2 L 或 4 L 的溶出杯。配套的杯盖可以用来阻止溶剂挥发, 但同时应提供足够的小孔, 以便在测试时插入温度

计或取样针。转杆位置应固定，其转轴不得偏离溶出杯垂直轴上任一点 2mm 以上，转动应匀速，没有明显晃动。转杆的转速应保持在各论中规定转速的 $\pm 4\%$ 以内。转轴有一个开口和三片弹簧夹，或者采用其他合适的方法使篮体固定在其上。每个元件均应由 316 号不锈钢或其他等同材料制成。除非另有说明，采用接缝焊接的不锈钢包衬（40 目或 $425\mu\text{m}$ ）或按其他特定方法。测试开始时，药物应置于干燥的篮体内，溶出杯内底与转篮底部的距离应为 $25\text{mm} \pm 2\text{mm}$ 。常见的仪器设计如图 3 所示。

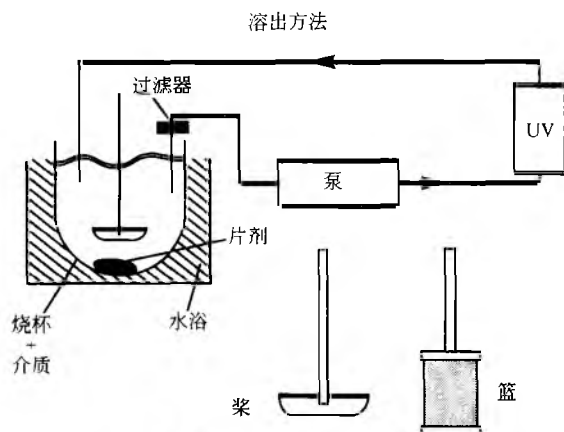


图3 篮法和桨法的常见装置

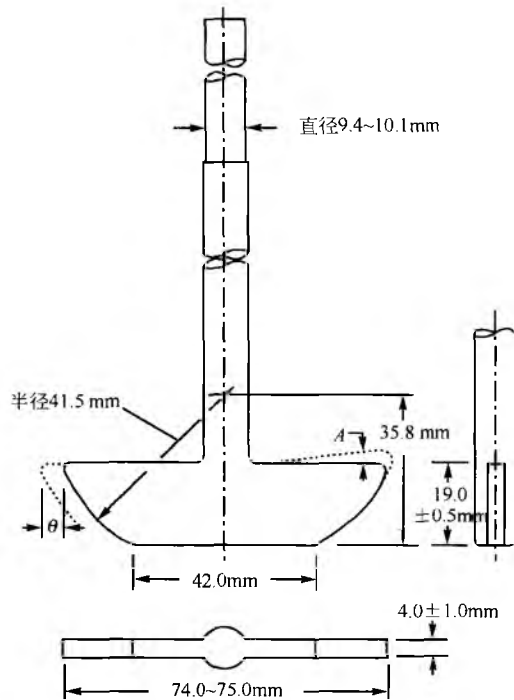
尽管 BP2000 和 USP24 收载的篮法装置基本一致，设计也相同，但与最初收载的篮法相比，已经发生了很大变化。USP18^[11] 采用底部微凹的圆柱形溶出杯，但没有给出这种微凹底的具体尺寸和不同厂商生产的溶出杯的允许误差。因此，使用不同厂商制造的溶出杯，得到的溶出速率也存在统计学差异^[12]。由于溶出杯的形状会影响系统的流体动力学，因此采用均匀半球形的溶出杯更好。BP1980 收载的平底溶出杯^[13] 缓解了溶出杯制造公差的问题。不考虑溶出仪的设计，仍存在几个潜在问题：篮体的金属网与酸性介质接触易发生腐蚀；转篮产生的转动不一致会使篮法重现性变差；篮体的网眼附着污垢后会被堵塞等。此外，颗粒会从篮体中掉落，沉于杯底，这样一来其所处的转动环境与篮内就不一致了。

2. 桨法

由 Levy 和 Hayes^[14] 提出的一种仪器装置可以认为是杯法（beaker method）的前身。其由一个 400mL 烧杯和一个位于中心的三片状聚乙烯搅拌器（直径 5cm）组成，在 250mL 溶出介质（0.1mol/L 盐酸溶液）中以 59r/min 的转速转动。片剂放置于烧杯内部，并定时取样。

在药典收载的 II 法——桨法中，以桨板代替了转篮作为搅动源。与篮法装置一样，转轴不得偏离溶出杯垂直轴上任一点 2mm 以上，转动时不得有明显的晃动。桨板的各个组件的规格如图 4 所示。试验时，桨板底部与溶出杯内底的距离应保持在 $(25 \pm 2)\text{mm}$ 。金属桨片和转杆组成一

个整体，其表面均应涂有合适的惰性材料以防止发生腐蚀。常见的仪器设计同样如图 3 所示。桨板开始转动前，样品应沉于溶出杯底部，另外建议使用沉降篮以避免胶囊和其他悬浮剂上浮，也可以在制剂上缠绕一小段无活性物质（如金属线圈）。Soltero 等^[15] 详细研究了沉降篮对明胶型胶囊剂溶出速率的影响。尽管官方建议使用不锈钢金属圈，但其形状却能够大大影响溶出速率。

图4 USP24 收载的桨法示意图^[8]

3. 数据表达和解释

在溶出试验过程中采集的数据，特别是在药物的研发阶段，可以用溶出曲线（图 5）来表示，即以药物释放量对时间作图。通常采集几个时间点的释放量，或者尽可能连续采集，直至药物 100% 完全释放，这样就可以画出药物释放量对时间的溶出曲线图。一般取药物释放量为 10%、50%、70% 或 90% 时所对应的时间点为 $t_{10\%}$ 、 $t_{50\%}$ 、 $t_{70\%}$ 、 $t_{90\%}$ 。片剂和胶囊剂的溶出曲线通常呈 S 形。

药典一般不要求绘制药物的溶出曲线，但要求药物在规定时间内必须达到一定的溶出量。如果规定单个时间点，并且药物溶出量已经达到其限度要求，那么实验只需持续较短的时间；如果规定两个或两个以上的时间点，取样应在规定时间的 $\pm 2\%$ 内完成。对于 BP^[9] 收载的地高辛片，每次实验的投片量超过 1 片，要求所有 6 份在 60min 内的释放量均应达到标示量的 75%。

USP24^[8] 将溶出结果的判定分为三个阶段条件。如果符合前两种条件中的任一种，就没有必要按第三种条件进行判断。条件 1，取 6 份试样进行试验，如果在规定时间内每份的溶出量均达到 $Q+5\%$ ，其中 Q 为以标示含量百分数

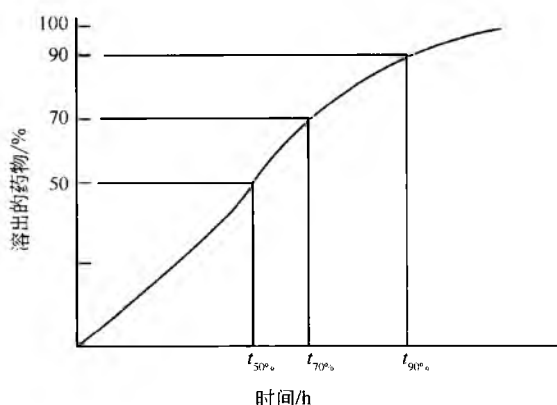


图5 假想药物的溶出曲线图, 图中显示
 $t_{50\%}$ 、 $t_{70\%}$ 和 $t_{90\%}$ 时的释放量

形式表达的已溶解活性组分的量, 5%为标示含量百分数, 那么结果就符合规定。不符合条件1则需要按条件2进行试验, 另取6份复试, 前、后12份的平均溶出量必须大于或等于 Q , 且不得有1份低于 $Q-15\%$ 。如果仍然不符合条件, 则按条件3再取12份进行复试, 所有24份的平均溶出量必须大于或等于 Q , 且不得有超过2份低于 $Q-15\%$, 不得有1份低于 $Q-25\%$ 。

4. 取样方法

USP24^[8]和BP2000^[9]均规定取样位置应为溶出介质表面和转篮(或桨板)上端的中间位置, 距离溶出杯壁不少于1cm的区域内。取样后应补充相同体积的溶出介质, 或者在计算过程中予以补偿。取出的样品应当过滤, 并且所使用的滤膜不得对溶液中的活性成分产生明显吸附或干扰溶出量的测定, 不得释放出任何干扰测定的物质。滤膜的孔径不得大于 $1\mu\text{m}$ 。当胶囊剂的囊壳对测定产生干扰时, 应至少取6粒完全去除内容物的空胶壳, 使其溶于溶出介质中, 同样品测定, 计算干扰因子, 其值不得大于标示量的25%。

5. 可能影响溶出的因素

BP2000^[9]和USP24^[8]均列出了可能影响溶出结果的外部因素。本节着重讨论比较重要的因素。

5.1 振动

溶出仪的任何部分, 包括其所处的环境, 都不得产生除转动元件匀速转动以外的明显晃动或振动。溶出仪的额外振动会大大提高溶出速率, 这一点是毫无疑问的。因此, 应当尽可能减小振动产生的影响, 规定了溶出仪电机到其底座间的距离, 以及转篮到转杆和电极连接点间的距离^[16]。振动有多个来源, 包括水浴和水泵。

5.2 转杆

导致溶出速率变化的许多问题是由转杆的偏心所引起的。转杆的偏心度应当予以限定。桨杆位置的微小改变也

会使结果发生大的差异。

5.3 溶出杯

半球形溶出杯允许存在一定的结构差异。溶出杯形状的微小变化会大大改变浆法的溶出速率^[17]。如果玻璃溶出杯的内底比规定的更平, 会使溶出速率产生较大差异; 如果其比规定的更陡, 则差异较小。这些差异是由不同形状的杯体导致不同的流体动力学所产生的。相对于玻璃溶出杯, 塑料溶出杯的半球形底更加完美, 形状也更加可靠, 如果它不会对药物产生吸附, 不会与溶出介质发生干扰^[17], 则其应优于玻璃溶出杯。然而, 塑料溶出杯并不是十全十美的。在溶出过程中, 使用玻璃杯的片剂比使用塑料杯的片剂更容易趋于溶出杯的中心, 这可能是由于片剂与塑料杯壁的摩擦力大于其与玻璃杯壁的摩擦力的原因^[18]。

5.4 取样方法

流通装置通常用紫外测定溶出药物, 或者收集样品做进一步分析(图3)。测定前必须进行过滤, 以防止不溶性辅料或正在溶解的药物颗粒通过光束。样品取出后测定含量之前进行过滤可去除固体微粒, 减少由未溶解药物和辅料引起的浑浊问题, 此外还可以帮助消除取样后颗粒溶解所产生的错误结果。

用于连续取样的取样针不得干扰系统的流体动力学。当通过流通系统进行连续测定时, 流速不可过高, 否则一些悬浮的药物将黏附于滤膜上, 产生滤过效应, 从而人为地提高了药物的释放量。使用自动取样方式时, 应当注意尽可能减少管路的总长度, 从而降低管路中的液体量。如果药物从取样到分析的时间滞后过长, 那么溶出量将偏高。

过滤时应当避免滤膜对药物的吸收。滤膜中通常含有一种叫异辛基苯氧基聚乙氧基乙醇的物质, 作为润湿剂, 其从滤膜中释放出来可能会产生潜在问题^[19]。这种表面活性剂在220~240nm的波长范围内具有明显吸收。滤膜孔径大小的选择也是相当重要的。例如, 相同直径的滤膜, 随着孔径的减小, 其对咪唑的吸收随之增大^[20]。此外, 补液的温度应与溶出杯内溶出介质的温度一致。最近的研究集中在使用紫外光纤探头传输溶出介质中光的可行性上, 这可能会发展成为一种利用光纤传导原位定点测定溶出量的新方法^[21]。

5.5 温度的控制

USP指出进行溶出试验前应当移走温度计, 而且水浴温度应当定期检查。溶出介质的温度应维持在 $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$, 温度的轻微变化会对片剂的溶出产生明显影响。

5.6 溶出介质的脱气

BP2000^[9]和USP24^[8]中均未规定溶解气体的水平, 但均规定使用前应当进行脱气。Cox等^[22]试验了泼尼松片在空气预饱和的水中的溶出情况, 研究结果表明, 在试验过

R

程中溶出介质必须保持在非饱和状态下。使用桨法时,初始空气的含量越高,药物的溶出百分量也越高。空气含量水平较高的溶出介质中的气泡,由于空气的吸附作用,会吸附片剂崩解时产生的颗粒,这些颗粒不会堆积于溶出杯的底部,而是伴随着气泡悬浮于溶出介质中,此时的搅动条件更易于药物的溶出。

使用篮法时,溶出介质不脱气,空气会堵塞篮体的网眼,从而导致溶出环境不同^[19],溶出速率通常会降低。在进行明胶型控释制剂的溶出试验时,这种影响更加明显。附着于片剂或胶囊上的气泡会使药物在篮体顶部附近重新分布,从而减慢溶出速率,降低溶出量^[19]。采用篮法时,片剂应保持在篮体中的固定位置,试验时药物在篮中发生崩解,溶出介质充分流经篮体,分散片剂,同时使药物溶出。

5.7 转速的差异

在试验过程中转速应保持一致,某些电动机的平均转速令人满意,但在试验过程中却会出现周期性的转速减慢或转速加快的现象。因此,每次试验开始和结束时均应对转速进行检查。

6. 标准化和校正

所有的仪器都必须经过校正、变量标准化并得到认可。设计溶出试验来检查实验操作和各个溶出杯之间的差异是可行的^[23],其目的是通过使用平均溶出时间和分部平衡法以实现实验装置的误差最小化。流体动力学的影响越大,变异系数越低。溶出试验是十分重要的,但却难以正确操作。标准化过程应消除所有的变异因素。符合现行 USP24 要求的仪器中也存在着类似的液体流动问题,虽然是半球形却能产生不同的流体动力学。

USP24^[8]规定了基于一定实验条件下的仪器适用性试验,并引入了崩解型和非崩解型两种 USP 溶出度校正片。如果试验结果在该类校正片规定的允许范围内,可以认为仪器是适用的。校正片也可用于检查仪器的缺陷,如传送带的松动、转动电机的倾斜、过多的振动或转杆与溶出杯不准直等。非崩解型校正片为规格为 300mg 的水杨酸片,而崩解型校正片则为规格为 50mg 的泼尼松片。转速分别为 50r/min 和 100r/min 时,测得校正片的溶出速率均应在规定范围之内。

7. 药典方法其他变量

BP2000^[9]通常规定溶出介质体积为 1000mL,地高辛片除外,其以 600mL 水为溶出介质。USP24^[8]中溶出介质的体积各种各样均有,如 500mL (阿普唑仑片)、750mL (甲酚氯酸胶囊) 和 900mL (氨苄西林胶囊)。体积也可根据制剂的规格相应变化。例如,对于盐酸芬特明胶囊,如果规格小于等于 15mg,溶出介质体积为 500mL;如果规格大于 15mg,则使用 900mL 的溶出介质体积。同样的情况还有泼尼松片,以 10mg 为分界点。另外,对于西诺沙星胶

囊,规格小于等于 250mg 时体积为 500mL,大于 250mg 时则采用 1000mL 的溶出介质体积。

限定溶出介质体积的其他方法

采用限定溶出介质体积模式的许多其他非药典方法已经出现,其中包括转碟法 (rotating-disc method),用于测定碟状制剂从一恒定表面溶出的速率^[24]。真正的溶出速率与溶解药物表面的溶出速率有关,可以通过具有恒定表面积 of 碟轻易测得,而碟的面积很容易进行估算。转动滤器固定篮法 (rotating filter-stationary basket apparatus)^[25]采用一个大容量烧杯 (1.5L),包括一个固定的样品篮和一个转动过滤篮。

此外,还包括磁力篮法 (magnetic basket apparatus)^[26]和已经商品化的 Bio-Dis 法^[27]。在 Bio-Dis 法中,采用垂直往返管,管的每端用网碟封住,防止药物滑出。USP24^[8]收录了药物释放第三法——往复管法 (reciprocating cylinder method)。往返管在溶出介质中来回升降,幅度为 9.9~10.1cm。这种方法已被推荐用于测定微丸系统的释放度,尽管其测定结果往往高于其他方法^[27]。

限定体积模式,即溶出介质体积一定,存在一个问题,即在非漏槽条件下使用,对于难溶性药物具有一定的局限性。前面所述的一些方法可以使用流通系统和储液器来加以改进,即通过移除溶剂,补充新鲜溶剂来提供漏槽条件。在不要求漏槽条件的情况下,也可以使用连续循环来实现。非流动法的不足之处^[28]包括:①缺乏灵活性;②缺乏一致性;③产生浓度梯度;④半定量的搅动;⑤溶出过程不易观察;⑥可变的剪应力。因此,流通法应运而生,其采用一个低容量溶出池 (通常低于 30mL) 和一个储液器来补充新鲜溶剂。

流通法

USP24 收录的流通池法^[24]可以采用密闭模式,此时溶出介质体积一定,进行反复循环;也可以采用开放模式,不断更新介质。其基本组成部分包括储液器、水泵、热交换器、池体、片剂支架、过滤系统和分析方法等。整个系统要求溶剂从合适的储液器进入,直接通过含有药物的仪器主机,或者测定含量或者去除 (流出系统, effluent system),或者再次循环 (循环系统, recycling system),如图 6 所示。

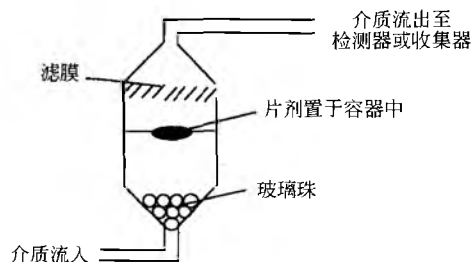


图 6 流通溶出池的示意图



将溶剂从储液器中转移出来的水泵设计非常关键,直接影响这类系统的试验结果。使用的泵可以为转移型(振动或蠕动),也可以为动力型(离心)。然而,蠕动泵会产生波动,会导致溶出速率加快。下列因素会影响溶出结果:液体流动速率、池的横截面、药物的初始量、液体黏度和药物浓度等。

通常采用从下向上流动的方法。流通系统消除了与非漏槽条件相关的一些问题。试验样品(片剂、胶囊剂或颗粒剂)放置于垂直固定的溶出池内,新鲜溶剂从池底泵入,流速为240~960 mL/h。玻璃珠(直径1 mm)可以控制整个溶出池横截面内的流动。该池的直径一般为12 mm或22.6 mm。

维持固定的流速对池法非常重要,可受入口系统的影响。仪器的设计已经改进,在入口管的上方安装一个由折叠金属丝制成的支架来支持样品,这样一来样品就浸没于相对静止的流出液中,与池体同中心^[29]。通常将样品置于这种支架上,但是与玻璃珠间的摩擦可能会加速药物的崩解,使溶出速率加快。片剂支架和液流分布的一致性为测定结果一致性的前提,人们已尝试着将片剂埋入玻璃珠中进行试验。

溶出介质

理论上,溶出介质的pH应尽可能与体内液体的pH接近。例如,0.1 mol/L盐酸溶液通常用于模拟胃部的pH,也可以使用人工胃液。食物能够使胃部的pH提高至3~5。尽管事实上片剂吞咽后将进入一个较低pH的胃部环境,但是药典中收录的多数溶出介质的pH均接近中性。使用表面活性剂和酶也可以大致模拟肠液,尽管表面活性剂可以通过胶束的增溶作用增加药物的溶解性。USP24^[8]和BP2000^[9]均指明溶出介质的pH应在各论规定值的±0.05之内。

对于难溶性药物,如炔诺酮,建议加入醇类溶剂,如异丙醇,从而使药物的溶解性提高一个级别^[30]。在水-醇混合介质中,溶出速率增加。复方炔诺酮美雌醇片的各组分在脱气水中的溶出速率各不相同,但在水-醇混合介质中却没有差别。因此,为了控制药品质量,对复方制剂中所有组分的溶出度均应进行考查。混合溶剂的使用同样会产生问题。醇类溶剂可能会由于延缓药物崩解而使溶出速率减慢,如氯噻酮在40%甲醇水溶液中的溶出^[31]。

使用两相溶出介质,使药物分配进入有机相,这样可以形成漏槽条件。此外,有机溶剂,如正己烷的使用也可以提供漏槽条件。对于难溶性药物(浓度<0.01%,质量浓度),可以使用超胶束浓度的表面活性剂,如加入十二烷基磺酸钠。然而,表面活性剂的加入可能会使溶出介质变得少有差别。在进行利福平的溶出试验时,建议使用0.4%十二烷基磺酸钠溶液代替0.1 mol/L或0.01 mol/L盐酸溶液^[32],因为利福平在表面活性剂溶液中更加稳定。若使用0.01 mol/L盐酸溶液,水浴温度37℃时,1 h和2 h后,分

别有13%和29%的利福平降解;使用表面活性剂溶液时,2 h后仅有2%的利福平降解。

体内外因素

在理想情况下,溶出试验提供的数据可用于判断制剂的优劣、可能影响生物利用度的生产工艺的变化、各批次间的重现性、生产厂商和场所的变更以及产品的稳定性信息。溶出试验还可用于开发新剂型,控制产品质量,以及指示生物等效性。此外,它还可作为预测药物体内疗效的一种手段^[33]。

良好的体内外相关性(in vitro-in vivo correlations)可以通过建立一种具有重现性的溶出度方法,包括正确选择溶出介质、搅动程度等来实现。在理论上,如果胃肠道内的条件能够在溶出实验中成功模拟,则可以实现体内外相关性。

对于某些药物,选择合适的溶出参数,溶出速率可与生物利用度相关。例如,Kingsford等^[34]报道,当以pH5.0的缓冲液为介质,用转篮法考查呋塞米的溶出时,30 min内的溶出百分量与口服呋塞米的生物利用度存在线性相关。因此,在一定情况下,可以用溶出数据来大致评价产品生物药剂学方面的变化,而不是纯粹靠生物利用度来研究^[35]。USP24^[8]对制剂的体内外评价有具体要求,包括速释(immediate release)制剂和缓释(modified release)制剂。

控释制剂的溶出试验

USP24^[8]同样收录了适用于缓释制剂的试验,称为“药物释放”试验,而不是溶出试验,其包括缓释(extended-release或slow-release)制剂和延缓(delayed-release,肠溶型)制剂。与传统制剂相比,前者的服用频率至少减少两倍。延缓制剂是在特定时间点时释放药物,而不是服用后迅速释放。

USP24收录的缓释制剂和延缓制剂试验均需要经过三个阶段。对于缓释制剂来说,通常规定三个时间点,用标示释药间隔(D ,小时)来表达。每个时间间隔的溶出量 Q 用标示含量表示,每个规定释药间隔的溶出量 Q 均有限度要求^[8]。开始取6片进行试验,在最后一个时间点时不得有1片超出规定范围或低于规定量。如果不满足该要求,应另取6片进行复试,以前、后12片的结果进行判断,在最后一小时12片的平均值不得超出规定范围或低于规定量,同时不得有1片超出规定范围的±10%或低于规定量的10%。如果仍不满足要求,则应再取12片进行复试,以前、后24片的结果进行判断,在最后一小时24片的平均值应在规定范围之内,或者不得低于规定量,同时24片中不得有超过2片超出规定范围的±10%或低于规定量的10%,并且不得有1片超出规定范围的±20%或低于规定量的20%。

R

肠溶片和胶囊的溶出试验

USP24^[8] 记载了用于延缓（肠溶型）制剂的两种基本试验方法，每种方法均改变溶出介质的 pH。方法 A 中，以 750mL 0.1mol/L 盐酸溶液作为酸性条件，2h 后取样测定，然后加入 250mL 0.2mol/L 磷酸钠溶液，调节 pH 至 6.8 ± 0.05 ，继续试验 45min。方法 B 开始以 1000mL 0.1mol/L 盐酸溶液为介质试验 2h，然后将介质完全更换为 1000mL pH=6.8 的磷酸盐缓冲液，继续试验 45min。同样，前面所述的三种试验标准也适用于酸性条件。

除了药典对延缓制剂的规定外，生产商也有其内部标准。肠溶制剂标准规定应当保证肠溶衣的完整性，但应对用于评价缓释药效的 pH 改变方法加以考虑。这种评价应确保以邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素为包衣材料的延缓制剂中经常发生的药物突释现象，在特定 pH 条件下不会发生。

缓释制剂的药物释放

人们已经开发了多种方法，用于研究 pH 变化对溶出试验的影响。例如，从 0.1mol/L 盐酸溶液到 pH7.5^[36]，或者 pH 在 22h 内从 1.5、4.5、6.9、7.2 ~ 7.5 逐渐升高^[37]。这些变化都是根据药物制剂经过胃肠道时所处环境 pH 的变化而设计的，但是药物在胃肠道内的停留时间可能短至 4~6h，也可能超过 24h，这与患者摄取的食物有关。为了测定骨架片在不同 pH 条件下的溶出曲线，另一个方法是绘制断面图^[38]，这样就可以得到药物释放量对时间和 pH 的三维立体图。这种三维图可以用于判断在哪个 pH 范围内药物释放速率大于规定值，从而避免药物在某个窄 pH 范围内发生突释现象。

在新型控释制剂的研发阶段，不但应将溶出试验作为一种质控手段，而且应将其作为判断制剂体内疗效好坏的一种工具，这是至关重要的。因此，为了有效地利用溶出试验，试验者必须理解药物从制剂中释放的机制。对于储库型缓释制剂，药物扩散通过一层屏蔽包衣，从而溶解释放，这时需要研究介质对药物溶解度的影响等因素。

对于亲水凝胶骨架缓释制剂，药物通过含水的黏性表面聚合体的侵蚀和扩散而释放出来，因此应当尽可能减少对表面聚合体提供额外力的或支持的因素。例如，在进行较大的膨胀骨架溶出试验的过程中，低转速时骨架由篮体壁支撑，从而导致偏离实际的缓慢药物释放。这与体内情况形成对照：由于胃肠道蠕动和食物存在，侵蚀程度越大，药物释放就越快。通过不同制剂的溶出试验，可以帮助处方设计者得到符合体内药物释放曲线的理想制剂。

图 7 举例说明了仪器方法和转速对 HPMC 骨架制剂体内释放曲线的影响^[39]。另一项研究表明，对于 HPMC 骨架制剂，当采用转篮法，转速为 150r/min 时，体外数据可与体内数据达到良好的相关^[40]。

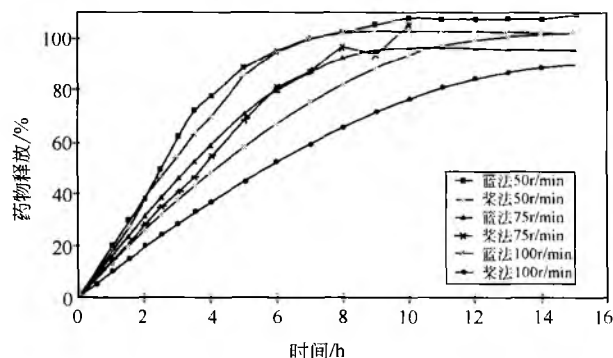


图 7 盐酸地尔硫草以 37℃、pH 6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质，分别以篮法和桨法，转速分别为 50r/min、75r/min 和 100r/min 时从膨胀骨架系统中溶出的曲线图

由于骨架型缓释片可能黏附于溶出杯的内壁上，使表面积减小。另外，桨板也可能破坏制剂的分散性，所有这些都引起附加问题。此外，含有高浓度磷酸盐的介质可能会导致羟丙基甲基纤维素材料的缓释骨架发生崩解。

微丸、微珠以及具有延时释放的其他微粒系统最好采用池法进行试验，因为该法易于改变 pH 或溶出介质。如果采用药典仪器方法，会出现问题。例如，采用桨法难以保留分散的微粒；采用篮法小微粒会通过篮体的网眼掉落出来。

近来，建议用一个定义为相似因子 f_2 的数学参数来建立简单模型^[41]，对溶出曲线进行比较，见式（4）：

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad (4)$$

式中， R_i 和 T_i 分别为对照物和试验物在每一对应时间点的溶出百分量。如果所有时间点的 f_2 值均小于 50，并且任一溶出样品间的平均差不大于 50%，则认为两组溶出曲线不同。相似因子和相似试验已被 FDA 工业指导原则推荐用于溶出曲线的比较^[35,42,43]。

栓剂和其他半固体制剂

半固体制剂包括透皮吸收制剂（软膏剂、霜剂、凝胶剂、贴剂）、阴道给药制剂（阴道栓剂）、眼用制剂（软膏剂、霜剂、凝胶剂）以及直肠给药制剂（软膏剂、霜剂、栓剂、凝胶剂）。药物释放测定应能确保药物不会受优先分配于油相中所困。与片剂和胶囊剂不同，在溶出研究过程中，为了对药物释放进行定量评价，这类制剂与溶出介质接触的表面必须存在一定的限制。

由于栓剂在试验中会软化、变形、崩解以及从固态转变为油状，所以容易出现问題。在溶出试验中，玻璃珠可以控制接触面积，因此建议采用一种叫做连续流动珠床柱状仪器（continuous-flow bead-bed column-type apparatus）来进行栓剂的溶出试验^[44]。采用水溶性载体，如聚乙二醇的栓剂，在药物释放过程中不会产生太多问题，因为这类



载体能够快速溶解。然而,油性基质的栓剂(如,含有可司油),溶化释放非常缓慢,展开的表面积在不断变化。因此,经常使用膜来包裹栓剂,尽管膜自身也可能限制药物的传输。此外,尽管使用了与 USP 篮体规格一致的聚氨酯篮体,但是由于篮体网眼容易堵塞,转篮法仍不适用。要设计出适用于两种类型栓剂的理想仪器,很可能需要双相。

透皮贴剂也可同样检查, USP24^[8] 收录了透皮给药系统的参考文献,操作温度一般规定为 $32^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。仪器装置包括改进的桨法(modified paddle method),使用一个直径为 41.2mm 的网碟,将贴剂固定于溶出杯底部;柱法(cylinder method),贴剂黏附于半径约为 2.2cm 的不锈钢圆柱体外表,在溶出杯中转动;往复碟法(reciprocating disc apparatus),网碟在已校正体积的容器中,以每分钟 30 个循环的速度往复运动,幅度为 2cm。

仪器自动化

采用人工方法进行溶出度试验劳动强度大,并且耗时,而采用微机控制则显得非常经济,特别当某些试验需要持续 24h 以上时。仪器自动化促进了含量测定技术的发展,小型取样针快速插入,快速取样,一切自动完成,对系统的流体动力学几乎没有影响。仪器自动化提高了含量测定的速度和溶出度试验的效率。然而,含量测定的快慢可能会成为溶出度试验效率的限速步骤,因此为了加快含量测定的速度,采用 HPLC 法时应该使用短柱。

含量测定方法

无论选择何种含量测定方法,必须对待测药物具有专属性。对于单方制剂,UV 或 HPLC 是最合适和最常用的方法。在存在适当的阴离子和阳离子时,可以使用离子型电极监测药物的释放。然而,对于复方制剂来说,可能需要多种复杂的含量测定方法,如果多种成分能够在同一个色谱系统中被分离分析,HPLC 法则显得非常有效。另外,紫外二极管阵列分光光度技术也越来越多地用于测定多组分制剂的含量。

参考文献

- Hixson, A.; Crowell, J. *Ind. Eng. Chem.* 1931, 23, 923—931.
- Lai, T. Y. -F.; Carstensen, J. T. *Int. J. Pharm.* 1978, 1, 33—40.
- Laakso, R.; Kristoffersson, E.; Marvola, M. *Int. J. Pharm.* 1984, 19, 35—42.
- Kitazawa, S.; Johnno, I.; Minouchi, T.; Ito, Y.; Okada, J. *J. Pharm. Pharmacol.* 1977, 29, 585—588.
- Higuchi, W. I. *J. Pharm. Sci.* 1962, 51, 802—804.
- Higuchi, T. *J. Pharm. Sci.* 1963, 52, 1145—1149.
- Lathia, C. D.; Banakar, U. V. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1986, 12, 71—105.
- United States Pharmacopeia 24 The U. S. Pharmacopeial Convention; Rockville MD, 1999.
- British Pharmacopoeia 2000 Her Majesty's Stationery Office; London, 2000; II.
- Pernarowski, M.; Woo, W.; Searl, R. O. *J. Pharm. Sci.* 1968, 57, 1419—1421.
- United States Pharmacopeia 18 The U. S. Pharmacopeial Convention; Rockville, MD, 1969.
- Rosolia, A. M.; O'Connell, J. R.; Bavitz, J. F.; Restaino, F. A.; Schwartz, J. B. *J. Pharm. Sci.* 1972, 61, 1638—1640.
- British Pharmacopoeia 1980 Her Majesty's Stationery Office; London, 1980.
- Levy, G.; Hayes, B. A. *New Engl. J. Med.* 1960, 262, 1053—1058.
- Soltero, R. A.; Hoover, J. M.; Jones, T. F.; Standish, M. *J. Pharm. Sci.* 1989, 78, 35—39.
- Embil, K.; Torosian, G. *J. Pharm. Sci.* 1979, 68, 1336—1338.
- Cox, D. C.; Wells, C. E.; Furman, W. B.; Savage, T. S.; King, A. C. *J. Pharm. Sci.* 1982, 71, 395—399.
- Cox, D. C.; Furman, W. B. *J. Pharm. Sci.* 1984, 73, 1125—1127.
- Cartwright, A. C. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1979, 5, 277—291.
- Ford, J. L.; Poole, V. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1991, 17, 639—647.
- Bynum, K. C.; Kraft, E. *Pharm. Technol.* 1999, 23, 10.
- Cox, D. C.; Furman, W. B.; Page, D. P. *J. Pharm. Sci.* 1983, 72, 1061—1064.
- Lewis, G. A.; Stevens, H. N. E. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1987, 13, 1809—1816.
- Levy, G.; Sahli, B. A. *J. Pharm. Sci.* 1962, 51, 58—62.
- Shah, A. C.; Peot, C. B.; Ochs, J. F. *J. Pharm. Sci.* 1973, 62, 671—677.
- Needham, T. E.; Shepherd, R. E.; Luzzi, L. A. *J. Pharm. Sci.* 1973, 62, 70—472.
- Pharmacopeial Forum 1989, 15, 4984—4992.
- Tingstad, J. E.; Riegelman, S. *J. Pharm. Sci.* 1970, 59, 692—696.
- Groves, M. J.; Alkan, M. H.; Deer, M. A. *J. Pharm. Pharmacol.* 1975, 27, 400—407.
- Goehl, T. J.; Sundaresan, G. M.; Prasad, V. K. *Int. J. Pharm.* 1983, 15, 115—123.
- Poirier, H.; Lewis, G. A.; Shott, M. J.; Stevens, H. N. E. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1983, 9, 443—452.

R

32. Gharbo, S. A.; Cognion, M. M.; Williamson, M. J. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1989, 15, 331—335.
33. Dressman, J. B.; Amidon, G. L.; Reppas, C.; Shah, V. P. *Pharm Res.* 1998, 15, 11—22.
34. Kingsford, M.; Eggers, N. J.; Soteros, G.; Maling, T. J. B.; Shirkey, R. J. *J. Pharm. Pharmacol.* 1984, 36, 536—538.
35. Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, Scale Up and Post Approval Changes, and In Vivo Bioequivalence Documentation CDER; FDA: USA, 1995; FDA Guidance for Industry.
36. Jalal, I.; Zmaily, E.; Nazib, N. *Int. J. Pharm.* 1989, 52, 63—70.
37. Graepel, P. H.; Momberger, H.; Kuhn, D. *Pharm. Zt.* 1986, 131, 1820—1823.
38. Skelly, J. P.; Yamamoto, L. A.; Shah, V. P.; Yau, M. K.; Barr, W. H. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1986, 12, 1159—1175.
39. Rajabi-Siahboomi, A. R., Ed.; unpublished data.
40. Eddington, N. D.; Marroum, P.; Uppoor, R.; Hussain, A.; Augsburger, L. *Pharm. Res.* 1998, 15, 466—473.
41. Moore, J. W.; Flanner, H. H. *Pharm. Tech.* 1996, 20, 64—74.
42. Dissolution Testing of Immediate Release Oral Solid Dosage Forms : , 1997, FDA Guidance for Industry.
43. Extended Release Oral Solid Dosage Forms, Scale Up and Post Approval Changes (SUPAC-MR), 1997, FDA Guidance for Industry.
44. McElnay, J. C.; Nichol, A. C. *Int. J. Pharm.* 1984, 19, 89—96.

(陈 阳 译)

乳剂和微乳

Gillian M. Eccleston

University of Strathclyde, Glasgow, United Kingdom

乳剂

乳剂是指由两种互不相溶的液体（习惯称为油和水）组成的非均相制剂，其中一种液体以细小的液滴状态均匀地分散在另一相液体中。乳剂是热力学不稳定的，除非加入第三种成分——乳化剂来增加其动力学稳定性，否则乳剂会因为液滴的融合或聚结而重新分离为油水两相。形成小液滴的液体称为分散相或内相，另一液体被称为连续相或外相。乳滴直径变化很大，但在药剂学中乳剂是典型的多分散体系，乳滴直径范围大致在 $0.1 \sim 50 \mu\text{m}$ 之间。根据连续相是水相或油相，通常将乳剂分为水包油型（o/w）或

油包水型（w/o）。图 1（a）显示的是一种简单的 o/w 型乳剂系统的显微照片。但实际应用的药用乳剂很少是由简单的油水两相制备的，许多是包括外加的固体或液晶相（如薄层状结构）多组分的系统 [图 1（b）]。复乳是对初乳用水或油进一步乳化形成的，具有两个分散相，同样也具药剂学研究意义。油包水包油（o/w/o）型复乳是一种内水相乳滴中含有油滴的 w/o 型乳剂；相反地，水包油包水（w/o/w）型复乳则是油相将内外水相分隔开的复乳 [图 1（c）]。这些更复杂的乳剂则包含在国际纯粹与应用化学联合会（IUPAC）对乳剂的广义定义中，它把乳剂的经典定义扩展为“液滴和（或）液晶分散在一种液体中”^[1]。

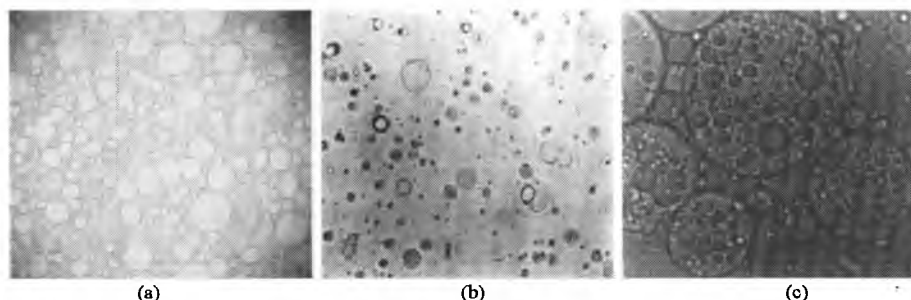


图 1 典型乳剂的显微照片。(a) 水包液状石蜡乳剂，加 1.89% 司盘-40 和 1.62% 吐温-80 使其稳定，在乳匀前可以清楚地看到油滴的多分散现象。(b) 水包液状石蜡软膏，加阳离子乳化蜡使其稳定，注意油滴周围有薄层状结构。(c) w/o/w 复乳，在大的油滴内能清楚地看到水滴

实际上乳剂用于所有主要的给药途径，已上市的包括许多外用、口服和注射制剂。内相可含有水溶性药物、防腐剂和矫味剂，同时油相本身可以具有治疗活性或作为水溶性药物的载体。乳剂提供了一种有效的途径来解决许多药物输送的问题，与其他剂型相比，在提高生物利用度和减少副作用方面显示出了明显的优势。尽管乳剂具有这些优点，但由于乳剂存在不稳定问题，导致不可预测的药物释放过程和可能的毒性，所以乳剂还是不如其他口服或非肠道给药剂型应用广泛。只有开发了可预测体外和体内释放行为的稳定乳剂，才有可能认识到乳剂的全部潜力。在过去十年，乳剂的研究主要基于试图揭示乳剂的稳定性、物理化学特性和生物学归宿之间的关系。尽管人们对复乳作为药物传递系统的应用越来越感兴趣，但由于其难以稳定和表征，目前还没有制剂上市^[2]。

药学上的应用

乳剂当前和潜在的药学应用参见综述^[3~6]。传统意义上的“乳剂”一词限定于内服液体乳剂，而外用乳剂通常细分为擦剂、洗剂和乳膏剂等药剂学剂型，这样就不能反映出到目前为止用于医药上最大部分乳剂为皮肤病外用乳剂这样一个事实^[7,8]。水包油型和油包水型乳剂具有治疗特性并可作为药物和化妆品皮肤使用的载体，均被广泛使用。通过乳剂覆盖作用和（或）加入促渗成分，乳剂可促进药物渗透进入和通过皮肤。特别需要关注的是患者对从液体擦剂和洗剂到半固体的软膏剂和乳膏剂的接受程度。过去，皮肤病乳剂的开发基本上是凭仅有的对基本原理有限认识的经验进行的。今天，尽管对许多这类复杂剂型的

微结构已经了解得比较清楚^[9,10]，但是乳剂的结构能影响药物生物利用度的机制还不清楚，而且关于乳剂对药物在皮肤释放的影响，许多文献的结果是矛盾的。大部分关于体外载体对药物释放的影响的研究仅基于处方本身，因此产生了一些混淆。大多数乳剂用于皮肤只是薄薄的一层，给药系统不是整个乳剂，而是一个动态的蒸发系统，在该系统中，相随着制剂的摩擦进入皮肤而发生改变，并且挥发性成分的相对浓度也改变了。因为亚微脂质乳剂能提高很多亲脂性药物的经皮渗透和效率^[11]，看来乳滴大小能影响药物输送到皮肤的效果。

口服乳剂绝大部分是水包油型的，由于水性外相有效地将油相和舌头隔离开，从而一定程度上掩盖了味觉。矿物油和蓖麻油在水中乳化用于口服给药局部治疗便秘已经很多年了（参见 USP 矿物油乳剂），同样也有各种来自鱼类肝脏的营养油（通常是大比目鱼或鳕鱼）或是植物来源生产的口服液体食物补充剂。早已明确使用 o/w 型乳剂作为亲脂性药物的载体能改善药物的口服生物利用度和功效^[3~6]。例如，与混悬剂、片剂或胶囊等剂型相比，灰黄霉素制成 o/w 型乳剂能提高胃肠道的吸收^[12]。虽然油相本

身影响了胃的蠕动，但乳剂调节和改善吸收过程的机制是复杂的，目前还不完全清楚。胆盐能增溶脂肪和油类，故服用乳化的含药油滴可能进一步增加液滴和药物的溶解，并且通过脂肪吸收途径转运通过胃肠道。

非胃肠道给药的乳剂类型主要是根据注射及其他应用途径划分的^[13~15]。水包油型乳剂可用于所有主要的非胃肠道给药途径，而油包水型乳剂通常用于需要缓释的肌肉或皮下给药。由于在这种油性乳剂中药物不得不通过油性连续环境从水性分散相扩散到达组织液，因而延长了药物的作用。油包水型乳剂用矿物油分散水溶性免疫抗原，用于经由皮下或肌肉途径注射，作为辅助制剂，它们能延长和提高抗原刺激，增加抗体效价。油性乳剂有希望作为癌症化疗的载体，在肌肉或肿瘤内注射后能延长药物的释放，同时能提高抗癌药经由淋巴系统的转运^[16]。缓释的油包水型乳剂由于油性连续相的黏度高，常常难以注射。虽然这些问题可以通过 w/o 初乳的再乳化以产生黏度低的复乳（w/o/w）加以克服，但有关 5-氟尿嘧啶的研究表明实际上复乳降低了药物的缓释效果^[17]。

表 1 一些上市的注射用营养脂质乳剂

商品名	油相/%	乳化剂/%	其他组分/%
Intralipid® (Fresenius Kabi)	大豆油 (10 和 20)	卵磷脂 (1.2)	甘油 (2.2), 磷酸盐 (15mm/L)
Lipovenos® (Fresenius Kabi)	大豆油 (10 和 20)	卵磷脂 (1.2)	甘油 (2.5)
Liposyn® (Abbott)	红花油和大豆油, 1:1 (10 和 20)	卵磷脂 (1.2)	甘油 (2.5)
Lipofundin® (Braun)	棉籽油 (15)	大豆磷脂 (0.75)	山梨醇 (5.0), DL-α-生育酚
Lipofundin N® (Braun)	大豆油 (10 和 20)	卵磷脂 (0.75 和 1.2)	甘油 (2.5)
Lipofundin MCT/LCT® (Braun)	大豆油和 MCT, 1:1 (10 和 20)	卵磷脂 (0.75 和 1.2)	甘油 (2.5)

灭菌注射用水包油型乳剂已广泛应用 40 多年了，它可用于虚弱患者的脂肪、碳水化合物和维生素的静脉给药。几种已经上市的植物水包油型乳剂的乳滴粒径类似于乳糜微滴 (0.5~2μm)，接近血液中天然脂肪微粒，这些微粒能传送摄入的脂肪进入淋巴和循环系统（表 1）。近来，乳剂已用作水溶性差的亲脂性药物的静脉给药载体，以替代传统的助溶剂、增溶用的表面活性剂或控制 pH 的注射液，如维生素 K（灭菌维生素 K₁ 注射液 U.S.P.）、地西洋（Diemuls®）、维生素 A（Vitlipid N®）和异丙酚（Diprovan®）等。当乳剂注射进入血液被血液稀释后，溶解在乳剂油相中的药物不会产生沉淀物和引起疼痛。如果是易水解或氧化的药物，则在乳剂的非水环境中受到保护。与其他增溶性制剂相比，地西洋及最近的克拉霉素乳剂在临床上疼痛较轻^[18,19]，同时含有两性霉素 B 的乳剂毒性也较低^[20]。与脂质体相比，乳剂也具有相同的效果，并且更加便宜，能很好地作为脂质体的替代品。在近期的书中有很多文献讨论了有关脂质乳剂在药物输送和靶向方面的潜力^[21]。

不透射线的感光乳剂，早就用作人体器官 X 射线检查用的显影剂。现在发现更复杂的技术信息用于更多的用途，

包括计算机 X 射线断层扫描术、超声技术和核磁共振技术。全氟化合物乳剂能作为人造血液代用品使用，与捐献的血液相比，有巨大的潜在优势，消除了供血者主要存在的血型不配和血液病的问题。第一个上市的产品是 Fluosol-DA®（绿十字公司，大阪，日本），它很多年前已经在很多国家进行了注册，用于减少做过血管成形手术患者的心肌梗死的发生率。然而由于 Fluosol-DA® 缓慢的排泄率和它显著的不稳定性，以至于只能冷冻保存。因此 Fluosol-DA 的上市并不成功。此外，有些患者对乳化剂普罗尼克 F68 敏感。近来为了解决使用 Fluosol 所遇到的问题，正在对第二代乳剂进行评估^[22]，这些将在本百科全书的其他章节中讨论。

有关乳剂在眼和鼻方面的应用研究较少。当家兔单次使用以脂质（亚微）乳剂作为亲脂性抗青光眼药物的载体，家兔的眼内压呈现长期持续的抑制效果^[23]。pH=8 的中等链长甘油三酯乳剂制成鼻腔控释制剂，可能会延长药物在鼻腔内的滞留^[24,25]（图 2）。当胰岛素加入 o/w 型乳剂的连续相中，可以观察到胰岛素在鼻腔内的转运增强，但当其加入 w/o 型乳剂的水相中则没有上述现象产生^[26]。

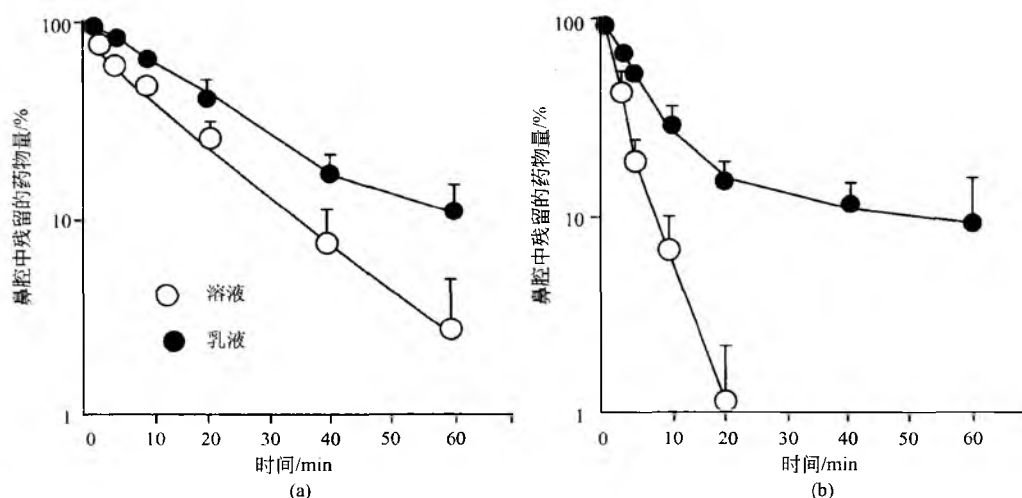


图2 大鼠鼻腔给予 o/w 乳剂和 pH 8 的水溶液后盐酸四氢唑啉 (a) 和马来酸氯苯那敏 (b) 从鼻腔的消除曲线^[25]

处方考虑

乳剂的最终使用和给药途径限制了乳剂中油相、乳化剂和乳剂类型 (O/W, W/O 或复乳) 的选择。必须重视最终处方中的潜在毒性和化学不相容性, 正如必须考虑影响乳剂稳定性和治疗响应因素的工艺细节, 例如乳滴粒径分布和流变学。目前设计具有合适的药物代谢动力学特征和组织分布的稳定乳剂是大家特别感兴趣的领域, 特别是静脉注射乳剂。注射后, 乳滴表面由于吸附了血液中成分而改变, 并迅速通过循环系统分布, 然后乳滴可能被机体像乳糜微粒一样对待, 或被作为外来的颗粒而被 RES 系统所清除。包括乳滴粒径和电荷, 脂质的类型和乳化剂的成分等许多因素都能影响乳剂的体内命运。口服乳剂的处方中一个应考虑的主要因素是胃液的低 pH 和高离子浓度, 这可能与乳化剂发生作用而降低乳剂的稳定性。

1. 药用油类

应用于制备药用乳剂的油有多种类型, 包括简单的酯、不易挥发性和挥发性油、烃类和萜类衍生物。这些油类可能本身就是药物, 也可以作为药物的载体发挥作用, 或有些含有丰富游离脂肪酸的不易挥发油相, 甚至可作为混合乳化剂系统的组成部分。许多油类, 特别是植物油, 很容易氧化, 并伴随着恶臭。有必要在这些油类中加入一定的抗氧化剂和 (或) 防腐剂来抑制它们的降解过程。对于外用乳剂, 单独使用或者与软质 (或硬质) 石蜡混合使用的矿物油被广泛用作药物载体或利用其覆盖和感官特性。最广泛用于口服制剂的油是非生物可降解的矿物油和蓖麻油, 这种油类能产生局部的导泻作用, 鱼肝油类或各种植物来源的不挥发油类 (如花生油、棉籽油和玉米油) 可作为营养补充剂。

出于安全性考虑, 注射用乳剂的油相选择受到了严格的限制。纯化的大豆油、芝麻油、红花油和棉籽油等主要由长链甘油三酯类组成, 由于它们无恶臭, 并几乎没有临床副作用, 已经用了很多年。近来已经认识到油类的结构会影响乳剂微粒注射后在体内的行为。包含长链和中链的甘油三酯的混合油不仅是很好的营养能量源, 并且它们能更迅速地由循环系统中清除^[27]。这样的混合油类现在已用于商业制剂 (表 1)。经酶修饰而结构改造的甘油三酯形成 1,3-特定位置的甘油三酯是人们日益感兴趣的一个领域, 因为它们能影响乳剂在体内的循环时间^[28]。纯化的矿物油现在已用于一些储库式油包水型剂型, 这些油类的毒性 (如在注射部位形成脓肿) 和其功效必须仔细权衡。倘若全氟化合物乳剂排泄相对快些, 则可以用于静脉注射。早期全氟化合物乳剂处方的主要问题就是油相形成了很稳定的乳剂, 而不能迅速地从体内清除。

2. 药用乳化剂

乳化剂不仅用于生产时促进乳化, 还能控制乳剂储存期间的稳定性, 让乳剂从临时配制能存放几天延长到上市制剂能存放几个月或几年。实际上混合乳化剂比单一乳化剂更常用。乳化剂通过影响乳滴的表面特性和大小分布, 从而影响到注射用脂质乳剂的体内行为。为方便起见, 多数的药学书籍将乳化剂划分为三个类型: ①表面活性剂; ②天然 (高分子) 聚合物; ③微粉化固体。

2.1 表面活性剂

药物制剂中作为乳化剂表面活性剂列于表 2。表面活性剂可由各种天然和合成原料生产而来, 因此在它们的同系物组成和起始原料中微量杂质表现出相当大的批次差异。例如, 卵磷脂表面活性剂中性磷脂量和非离子聚乙烯表面活性剂环氧乙烷的摩尔数就表现为批次差异。这种批次差异导致

的乳化性质的差异的机理现在已经更为人们所理解^[29]。

R

表 2 合成表面活性乳化剂

分 类	举 例	类 型	配 伍
阴离子型			pH>7 时显示多种不同的作用；不能与阳离子表面活性剂和多价阳离子配伍
碱性和胺皂	硬脂酸钠	o/w	
二价和三价金属皂	油酸钙	w/o	
有机硫酸盐	十二烷基硫酸钠	o/w	
阳离子型			pH<7 时显效；不能与阴离子表面活性剂和多价阴离子配伍
季铵化合物	十六烷基三甲基溴化铵	o/w	
苯基偶氮二氨基吡啶化合物	西吡氯铵	o/w	
非离子型			pH=4~8 显示多种不同的作用；能和离子表面活性剂和多价离子配伍
聚氧乙烯醇乙醚	Ceteth 20	o/w	
聚氧乙烯醇脂肪酸酯	聚氧乙烯 40 硬脂酸酯	o/w	
聚氧乙烯醇乙氧化脂肪酸酯	脱水山梨醇单油酸酯（司盘-80）	w/o	
	聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯（吐温-80）	o/w	
聚合物型			
聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物	普洛沙姆, Pluronic F-68®	o/w	
两亲型			通常与表面活性剂混合使用形成 o/w 型乳剂
脂肪醇	十六烷醇	w/o	
脂肪酸	硬脂酸	w/o	

尽管文献中研究的大部分乳化剂是合成和半合成的表面活性剂且其中很多已上市，但是由于毒性（如溶血性）和对皮肤及胃肠道黏膜的刺激问题，它们在药用乳剂中的应用受到限制。一般阳离子表面活性剂的毒性和刺激最大，非离子表面活性剂的毒性最低。因此表面活性剂主要以较低的浓度用于局部给药的制剂中。季铵化合物是皮肤科制剂的重要阳离子乳化剂，因为它们除有 O/W 乳化作用外，还有抗菌的特点。由于每个脂肪族原料均可通过引入环氧乙烷基来改变聚氧乙烯链长度，所以有许多具有不同油水溶解性的非离子表面活性剂上市。但仅有有限的一部分聚山梨醇表面活性剂应用于口服乳剂，而植物或动物来源的卵磷脂表面活性剂及非离子型聚氧乙烯和聚氧丙烯嵌段共聚物泊洛沙姆 188（Poloxamer F68®）可用于非胃肠道给药的制剂（尽管有些患者使用第一代全氟化合物乳剂时对这种共聚物敏感）。乳化剂通过改变乳滴的表面特性来影响乳剂的稳定性和它们的体内分布。

2.2 天然大分子材料和微粉化固体

天然来源的材料通常是来自于动物或植物（表 3），其中许多都易于降解。例如，解聚作用（多糖）或水解作用（类固醇）通常会引起乳化能力的降低。有些材料，特别是多糖和蛋白质为微生物提供了一个良好的培养基，因此含有这些物质的乳化剂的防腐保存是绝对必要的。为了克服这些问题，可以使用许多纯化和半合成的衍生物，其中包括各种纯化的羊毛脂衍生物和半合成纤维素，如甲基纤维素和羧甲基纤维素钠。这类衍生物一般都比未经修饰的材

料稳定。纤维素通常用于口服制剂中，而由于对皮肤对其有不适的感觉，故不适宜局部用药。类似于黏土之类的微粉化固体可作为结构支持剂用于皮肤科制剂中。

3. 防腐剂

乳剂在配制时必须防止微生物的侵害，因为微生物不仅能影响乳剂的物理化学性质，引起颜色、气味或 pH 改变，甚至能引起相分离，而且微生物还能危害健康。染菌的潜在来源在于天然原料（特别是天然产物）、水、生产和包装设备，或患者本身。由于水连续外相能为细菌、霉菌和真菌的生长提供理想的环境，因此 O/W 型乳剂比 W/O 型乳剂更易受到微生物的侵害。注射用乳剂通常不使用防腐剂，而采用高压灭菌，但有时也用无菌成分，在无菌条件下进行最终乳剂的灌装。

没有一种简单的方法能预知某种防腐剂对某种乳剂效果特别理想。防腐剂除了要对细菌、酵母菌和霉菌有一个广谱抑制活性，还必须无毒、无刺激性和无光敏活性。通常口服和局部用乳剂中使用的防腐剂有苯氧乙醇、苯甲酸、对苯甲酸酯和氯甲酚。乳剂是非均质产品，防腐剂分布于油相和水相之间，为了确保防腐剂在水中能形成一个足够起作用的浓度（通常是未电离的），pH 也是另外一个应该考虑的因素。乳剂处方中使用了多种材料，如亲水胶体或聚氧乙烯表面活性剂，这些都能与防腐剂相互作用，从而减弱防腐剂的效能。因此认为使用单一的防腐剂是不理想的，尽管可能产生另外的相容性问题，但越来越认识到应使用具有较广谱效能的混合防腐剂。



表 3 天然来源的乳化剂和固体乳化剂

分 类	举 例	乳剂类型给药途径	注 释
多糖	阿拉伯胶	o/w; 口服	宽 pH 范围内稳定 宽 pH 范围内稳定, 不易于水解 乳化特性有赖于 pH
	角叉菜	o/w; 口服	
	甲基纤维素	o/w; 口服, 注射	
蛋白质	明胶	o/w; 口服	乳化能力有赖于阴性脂类数量
葡萄糖苷	皂苷	o/w; 局部	
磷脂	卵磷脂	o/w; 口服, 注射	
甾醇	羊毛脂	w/o; 局部	单独使用时乳化效果差
	胆固醇及其酯	w/o; 局部	
微粉化固体	皂土	o/w 和 w/o; 局部	胶凝作用有赖于加工的条件
	硅酸镁铝	o/w; 口服, 局部	
	氢氧化铝	o/w; 口服	

4. 抗氧化剂和润湿剂

为了防止储存过程中油相、乳化剂或药物本身的氧化腐败,许多药物制剂中都加入了抗氧化剂。否则,这样的腐败使处方不稳定,也会产生令人不适的气味或味道。有些乳剂的油相中已经含有抗氧化剂。药剂学上通常使用的抗氧化剂包括叔丁基对羟基茴香醚(BHA)和二丁基羟基甲苯(BHT),它们的浓度上限为 0.2%,还有没食子酸烷酯。皮肤用制剂通常加入润湿剂,如丙二醇、甘油和山梨醇(5%),以减少乳剂储存和使用中水分的蒸发。虽然润湿剂的使用能防止水分从皮肤表面的蒸发,但是高浓度润湿剂的使用会发生相反的作用(即去除水汽和使皮肤脱水)。

乳剂的制备

基本上,乳化时需主要考虑两方面:首先是形成正确类型的乳剂——水包油、油包水或具有所要求乳滴大小分布的复乳;其次是所形成分散乳滴的稳定性。在没有其他添加剂的情况下,当两种不相溶液体混合或机械搅拌时,两相液体都趋于形成不同大小的乳滴。乳滴的大小分布取决于搅拌过程的力度,其每相乳滴的数量取决于它们的相对体积。取决于总表面积和界面张力的系统表面自由能会随着分散时所形成表面积的增加而提高,该系统是热力学不稳定的。为了减少这些情况,首先假定高能乳滴是球形的,因为在这种情况下,特定体积的液体有最小的表面积,并且在碰撞中乳滴将融合以减小界面面积,界面张力维持不变。

不论是水包油型还是油包水型,乳剂的类型取决于每种乳滴的相对合并率,较快融合的乳滴将形成持续相。通常,这会是量大的液体,因为乳滴数量上的优势增加了碰撞和合并的概率。尽管油和水相的体积接近 50%,但其他因素也很重要。例如,每种液体加入的顺序和速度。如果停止搅动,合并还将继续直到液相完全分离,这种状态下自由能量最小。因而,乳化可以认为是两种过程竞争的结果,也就是将大量液体分散成乳滴的过程和重新合并乳滴回到原始的大量液体过程的竞争。随着表面活性剂和其他

种类乳化剂的使用,形成的乳剂类型也不再是简单的相体积的作用和搅拌的顺序,还需考虑乳化剂在油和水中的相对溶解度。一般而言,乳化剂最相溶的液相会成为连续相(Bancroft 法则)。因此,亲水聚合物和表面活性剂可以促进形成水包油乳剂。相反,亲脂表面活性剂可以促进形成油包水乳剂。在乳化剂溶解性最好的相中首先发生相合并,因为当乳滴发生碰撞,乳化剂会较容易从接触面转移进乳滴,从而对乳滴合并几乎没有保护作用。理论上讲,乳剂的分散相可以占到相体积的 74%,要制备如此高内相的水包油乳剂需采用合适的表面活性剂才可制得。由于涉及乳剂稳定性的空间机理(在随后讨论),分散相体积超过 50%的油包水乳剂较难制得,并且有时额外的水分会使其转变为水包油乳剂。

1. 乳剂的特性

一般而言,乳剂表现为它的外相特性。有多种方法可以鉴别乳剂的类型。稀释法是根据乳剂只和形成连续相的液体相混溶的特性而建立的。电导率测量是根据油的导电性比水更差,当油是连续相时,油包水乳剂的电导率低。染色测试法在乳剂表面喷洒水溶性染色剂,可以显示连续相的种类。水包油乳剂中染色剂会快速融合到系统中,相反,油包水乳剂中染色剂会形成显微镜下可见的团块。加入油性染色剂则会发生相反的情况。这些测试可以从本质上鉴别连续相,但无法表明是否是复乳。复乳鉴别可以采用显微镜。

2. 流变学

乳剂的流变性受许多互相作用因素的影响,包括连续相的种类、相体积比以及粒子粒径分布,后者的影响较小。从液态到半固态的变化可以通过改变分散相体积和(或)乳化剂的种类和浓度来制得。对于低内相体积的乳剂,其稠度通常接近连续相。因此,油包水乳剂通常比水包油乳剂要稠,而水包油系统可以通过添加树脂、黏土和其他增稠剂,以引入塑性或假塑性流体属性来增加稠度。某些混合乳化剂与水相互作用以形成黏弹性连续相制得半固体水包油霜^[7]。

3. 乳滴粒度分布

出于对稳定性和生物药剂学的考虑,药用乳剂的乳滴粒径分布至关重要。粒子越大,合并的趋势越明显,乳滴也会进一步增大。因此,小粒子有助于提高乳剂的稳定性。粒径分布受乳化剂性质和制备方法的影响。从生物学的角度来看,良好的乳化可以促进肠胃吸收,同时这也是单独口服营养油制剂或药物溶解在油中制成口服制剂所希望的,但对于用于局部给药的、吸收后有毒性作用的矿物油可能产生相反的临床效果。计算机断层摄影术中用作造影剂的乳剂的乳滴大小为 $1\sim 3\mu\text{m}$ 。非肠胃使用的乳剂分散的乳滴大小应当为 $100\text{nm}\sim 1\mu\text{m}$ 。因为有肺部栓塞的危险,在任何情况下,乳滴直径应不大于 $5\mu\text{m}$ 。有明确的证据表明,与其他的胶体制剂一样,乳滴粒径分布会影响非肠胃乳剂的清除动力学。较大乳滴被看成异物,而很快被 RES 系统清除,而较小乳滴则当成天然脂蛋白,在体内具有不同的行为^[30]。皮肤病制剂的给药也会因脂质乳剂包含亚微粒乳滴而有所改善^[11]。

乳剂的稳定性

一种稳定的乳剂是指,分散的乳滴在一定的保存期限

内保持它们初始的特性并均匀地分布在连续相中。在储存过程时,应无相变化和微生物污染,乳剂应当维持其良好的气味,颜色和稠度。化学和物理性质不稳定性的可能是乳剂处方原因引起。化学不稳定性,诸如由于空气中氧气的氧化作用而导致植物油产生酸败,由于水解作用导致大分子乳化剂的解聚,或者微生物的降解作用,均可通过添加合适的抗氧化剂和防腐剂来减少其发生。更常见的化学不稳定性,包括药物和乳剂辅料之间或辅料本身相互作用,可能会导致物理不稳定性。如果这些相互作用与乳化剂有关,它们可能会破坏其乳化性,引起乳剂破裂。例如,酚类防腐剂和聚氧乙烯非离子型乳化剂的相互作用会导致无乳化作用和差的防腐效果。

物理不稳定性

由于乳剂内在就不稳定,它们会破裂,最终转变为最初的分层的两相液体。在乳化剂和其他添加剂存在的情况下,这种状态可以通过不同的过程产生,它们中有些过程(如分层和絮凝)是可逆的,而有些过程(如合并和奥氏成熟)是不可逆的。水包油乳剂转变成油包水乳剂或油包水乳剂转变成水包油乳剂的相转变过程,是只有在特定条件下才会发生的不可逆的不稳定过程,如由于与添加剂的相互作用或是温度改变而造成的乳化剂溶解性的改变(图3)。

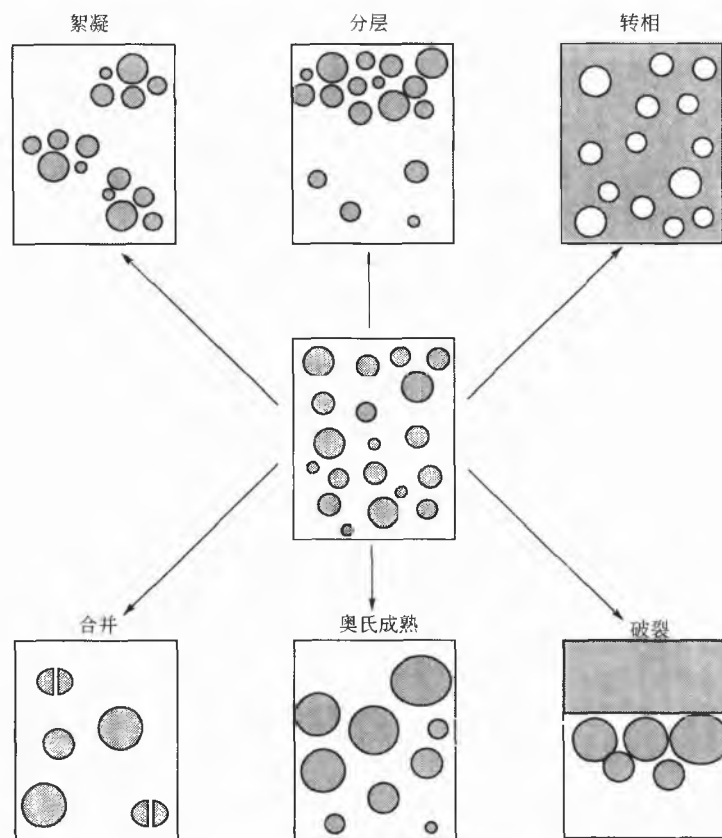


图3 各种不同破乳过程的示意图



絮凝是在乳剂小球之间被连续相薄膜层分隔开的微弱可逆结合作用。单个乳滴保持各自独立的特性，而每个乳滴的絮凝物或团块在物理上是独立单元。结合作用是乳滴间引力和斥力相互作用的结果并且是可逆的，从这个意义上来说，其在轻微的搅动时可以恢复最初的分散状态。虽然有时絮凝和合并的间隔时间会由于吸附了乳化剂而无限延长，而有助于形成一种动力学稳定的乳剂，但常认为絮凝是合并这一不可逆过程的前兆。

合并是分散相乳滴合并形成较大乳滴的过程，发生在两个不同的阶段。合并是从油滴间连续相液膜层在油滴互相接近时变薄开始的，当膜层达到临界厚度时因破裂而结束。互相接近的乳滴可能会变形，在连续相黏流形成的水压下，相对的表面会弯曲而变平（小乳滴）或形成小窝（大乳滴）。

合并并不是使分散相乳滴变大的唯一机制。如果乳剂是多分散的，并且油相和水相之间可充分混合，那么也会出现奥氏成熟，此时乳滴的增大是由于大乳滴消耗了较小乳滴。这种不稳定过程是 Kelvin 效应的结果，它会发生在小乳滴（小于 $1\mu\text{m}$ ）比大乳滴（即占大部分的物质）有更高溶解度（蒸气压）时，因而是热力学不稳定的。为了达到平衡状态，这些乳滴的分子在连续相中溶解和扩散而增大了较大的乳滴。当小乳滴失去它们的油相时，它们变得更小，蒸气压差变得更大，奥氏成熟也进一步增强了。

分散乳滴或絮状沉淀在重力作用下分离而形成更集中的乳剂，即发生分层。通常，分层的乳剂能通过轻微搅拌而恢复到其原来的状态。这个过程可能与絮凝发生混淆，根据 Stokes 定律的推论，在任何稀乳剂中如果在相之间有密度差异，分层是必然会发生的过程，而絮凝是由于粒子间引力和斥力的平衡相互作用。大部分油的密度比水小，所以在水包油乳剂中的油滴会浮到表面形成乳油的上层。在油包水乳剂中，水滴沉积导致乳油，并形成较低层，根据 Stokes 定律，分层速度可以通过减小乳滴的大小和（或）增加连续相稠度来降低到最小。调整两相密度很少受到重视。

不稳定过程并不独立，其互相之间都有影响或受其他影响。例如，在合并或奥氏成熟后增加的乳滴的大小会增加分层速度，这样可形成作为一个整体的大絮状沉淀。实际上，分层、絮凝和奥氏成熟可能会同时发生，或者以任何顺序伴随着合并发生。

显然，合并和奥氏成熟是不稳定性中最严重的类型，因为它们都会导致形成更大的乳滴而最终导致相分离。另外，分层和絮凝是不稳定性中更微妙的形态，因为它们由于乳滴的紧密靠近表现出可能的发展方向是合并和破裂，但许多实际的乳剂都会长时间地维持在这个状态而没有明显的合并，并且可以通过振摇容器而容易地重新分散。

增加乳剂稳定性

乳化剂可以通过很多不同的途径来稳定乳剂，所有的

乳化剂都是通过阻止或延缓先前提到的各种不稳定过程而起作用的。乳化剂可以在油-界面形成界面膜和（或）构成连续相（即变厚）。界面膜可以在乳滴之间形成外加的斥力（如静电的、空间的或水合的）来抵消范德华引力，阻止乳滴的互相接近。它还可以阻止乳滴的合并，尤其是当膜层是紧裹的有弹性的。表面活性剂界面膜层也可以降低油和水之间的界面张力。虽然这种效果在促进乳滴破裂的乳化过程中是重要的，但在维持乳剂长期稳定中它还不是一个主要的因素。在使用乳化剂增厚的乳剂中，界面膜层在维持稳定性中不占主导地位；而它仅仅是构成一个连续相以形成流变屏障来阻止运动和乳滴的紧密靠近，同时也抑制奥氏成熟。

1. 经典（界面）理论

乳剂稳定性的经典理论集中在吸附的乳化剂膜层通过改变分散的乳剂乳滴之间的作用力而对絮凝和合并过程的影响。它们并不考虑奥氏成熟或分层的可能性，也不考虑乳化剂对连续相流变性的影响。当两个乳滴互相靠近时，它们会受到强大的范德华引力，引力会将它们拉得更近。吸附的乳化剂通过引入外加的斥力（如静电的或空间的）抵消范德华引力并阻止乳滴接近来使整个系统稳定。静电作用对离子型乳化剂尤其重要，而空间效应在非离子型聚合物和表面活性剂以及油包水乳剂中占主导地位。将胶体理论应用到离子型和非离子型表面活性剂稳定的乳剂中已经被综述，对聚合物增加分散体稳定性有更多的介绍^[4,31,32]。

DLVO 理论是由 Derjaguin 和 Landau 以及 Verwey 和 Overbeek 各自独立建立的理论，用于定量分析静电作用力对疏液的胶体微粒稳定的影响，该理论已经适用于描述相似作用力对絮凝的影响以及离子型乳化剂增加简单乳剂的稳定性。乳剂乳滴表面上的电荷起源于吸附的表面活性剂的亲水部分的离子化，并且产生双电层。理论方程式最初是用于处理直径小于 $1\mu\text{m}$ 的单分散性的无机固体，但当应用于最简单的乳剂时就应当做相应的修正，因为吸附的乳化剂只有有限的厚度，并且和固体不一样，乳滴可以变形和合并。Washington^[33]指出在脂质乳剂中，因为溶剂分子间的距离近而在该理论中没有考虑的外加斥力也是重要的。

该理论指出当同样的双电层叠加时，乳滴间的作用力可以被认为是范德华引力 V_A 和静电斥力 V_R 的总和。因为每种力的来源相对于另一种都是独立的，所以每种力都要独立评价，而在两个乳滴间相互作用的总势能与其表面分离程度的函数关系如下，总势能 V_T 可以由以下公式表示：

$$V_T = V_A + V_R$$

图 4 (a) 是相互作用的势能相对于距离的示意图。从图 4 中可以看出，在乳滴相距很远时有很弱的引力，用第二最小值表示，而在乳滴相距很近时有很强的引力，因而形成了很深的第一最小值。在中间距离时，双层斥力占支配地位，所以曲线形成了一个最大值。絮凝发生在第二最小值，此时引力相对较弱，且絮状沉淀可以用低能量的搅

R

动轻易地分开。一旦发生絮凝，乳滴就会被势能屏障阻止相互靠近。如果它们有足够的能量克服屏障，那么当乳滴靠近时合并过程就会开始。一旦在第一最小值时形成的集合体仅分开很小的距离，界面膜层破裂阻力就成为对抗合并的稳定性决定因素。

对乳剂稳定性至关重要的能垒高度取决于乳化剂离子化的状态。大部分的表面活性剂处于使用时 pH 的状况下完全解离，因为此时表面势能高，会形成相应较高的能垒。表面势能无法直接测量，但可以通过实验得出的 Zeta 电位估算出来。在脂质非肠胃营养乳剂中，静电屏障是由在油滴-水界面的乳化剂膜中带负电的磷脂电离产生的。在生理 pH 时，典型的脂肪乳剂带负电荷，Zeta 电位为 30~60mV。因为高势能屏障而确保乳剂的稳定。电解质的加入或 pH 的改变会破坏乳剂的稳定性，因为压缩了双电层而减小了 Zeta 势能和能垒，会使乳滴过渡到第一最小值。所以在向营养乳剂添加电解质时需要格外注意。使用像蛋白质和树胶乳化剂，与离子化程度相关的乳化能力同样取决于 pH (表 3)。

DLVO 理论没有解释通过吸附非离子型表面活性剂和聚合物而稳定的油包水乳剂和水包油乳剂的稳定性，这种情况中电的作用通常只是次要的，而空间力和水合力变得

更为重要，因为当吸附的聚合物层或非离子型聚醚表面活性剂的水化链混合在两个紧密靠近的相似乳滴时，会损失熵 [图 4 (b)]。在用聚醚表面活性剂稳定的乳剂中，这种相互作用在非常小的距离时是重要的，并且会受温度和聚氧乙烯链的水合程度的显著影响。如果有环氧乙烯-环氧丙烯的嵌段共聚，如泊洛沙姆，水合聚氧乙烯链可以伸到连续相中以提供空间的稳定性，而疏水的环氧丙烯会附着在乳滴表面而形成防止合并的有效保护层。当乳滴表面被聚合物链完全覆盖，导致解吸附作用和聚合物的侧向移动被抑制时，稳定性是最佳的。对油包水乳剂，被吸附的乳化剂链的空间障碍也同样会导致在小分离距离上的熵斥力。

某些天然的聚合乳化剂，如树胶，除了可以形成空间和静电屏障外，还可以形成厚的多层膜，可以很好地阻止膜破裂。它们也可以使水包油乳剂的连续相增稠，从而减慢在合并最初阶段膜层消耗的速度。如果细小的固体微粒可被两相润湿，并且互相具有足够的附着力而形成了黏附的界面膜层，则可以稳定乳剂。膜层相当于机械屏障，可以阻止乳滴的合并，如果带电荷，静电机理会更有助于乳剂的稳定。虽然固体本身通常不会充分地稳定乳剂，但它们常常会增强其他乳化剂的效果。

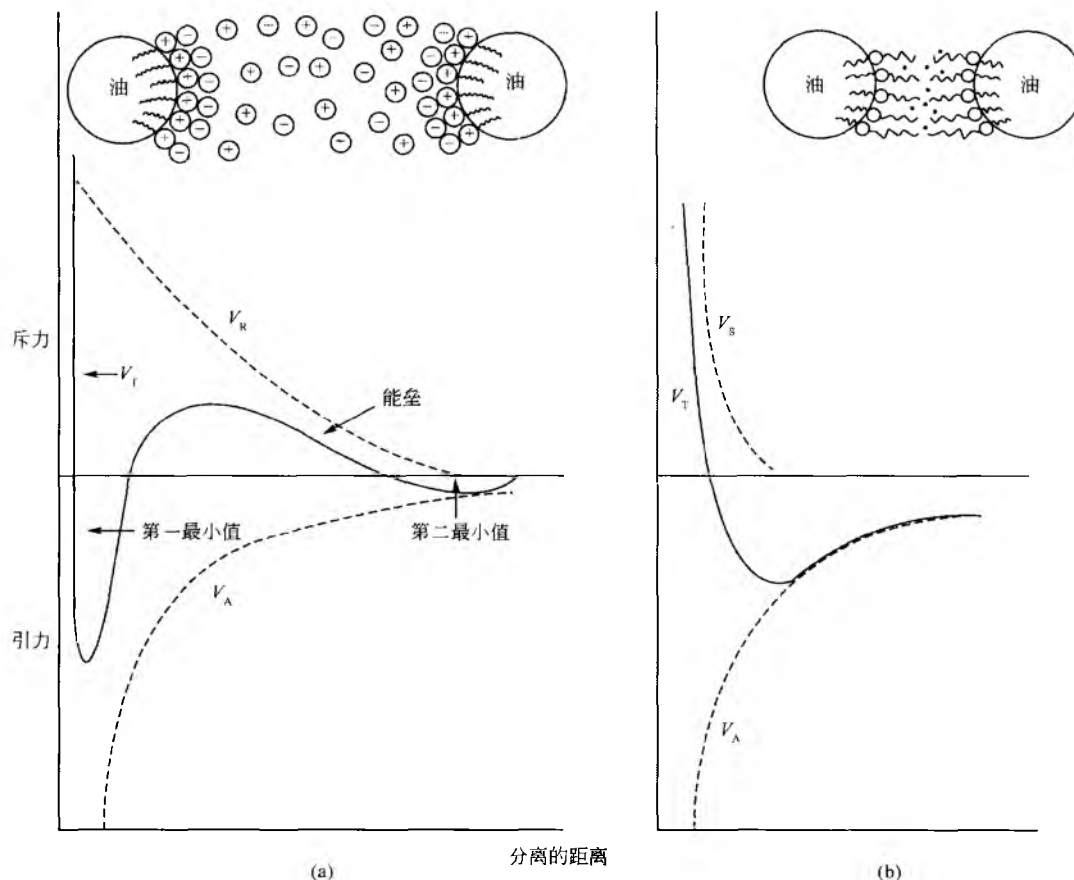


图 4 水包油乳剂中两个相似的油滴相互作用的总势能 V_T 与表面分离距离 H 的关系。(a) 由离子型表面活性剂的单分子层引起的静电稳定。(b) 非离子型表面活性剂的单分子层产生的空间稳定。 V_A 为范德华引力， V_R 为静电斥力， V_S 为空间斥力



2. 使用混合乳化剂提高稳定性

不论是内服的稀液体还是用于皮肤的稠的半固体状霜剂,大部分的药用乳剂都含有混合乳化剂,因为这些可制得更稳定的制剂。例如,传统的口服制剂有时可以使用树脂混合物,如阿拉伯树胶和黄蓍胶;采用高低亲水-亲油平衡值的(HLB)非离子表面活性混合物通常比单一的表面活性剂形成更稳定的乳剂。用于稳定非肠道乳剂的卵磷脂通常是中性和带电脂质的混合物,就像部分中性化的甘油酯一样,如自乳化的硬脂酸甘油酯。微溶的长链酸、醇类或甘油酯与可溶的离子型和非离子型表面活性剂的联合使用,广泛地应用于皮肤给药的水包油洗剂和乳膏剂,有时它们会被加入到预先混合的乳化蜡状物中(表4)。表面活性剂/脂肪酸联合使用也出现在用新生皂方法制备的传统擦剂和洗剂的乳剂处方中,以及通过三乙醇胺和过量脂肪酸相互作用而原位制备的三乙醇胺皂的制剂中。

表4 典型的乳化蜡和它们组成的表面活性剂

乳化蜡	成分
乳化蜡 USNF	棕榈醇, 聚山梨酯
阳离子乳化蜡 BP	棕榈醇, 十六烷基三甲基溴化铵
西地马哥 (Cetomacrogol) 乳化蜡 BP	棕榈醇, Ceteth 20
硬脂酸甘油酯 SE	硬脂酸甘油酯, 肥皂

从 DLVO 理论得到的方程式即使修正到可以用于空间斥力,也不能用于混合乳化剂。在乳剂模型[图1(a)]中增加稳定性并不都是由于对絮凝的控制(虽然这已经发生了),而更应当是由于紧密包裹了吸附的单分子层中的分子产生更刚性和浓缩的膜层,阻止或是延迟了合并。大量证据表明,乳化剂成分间相互作用形成的液晶或凝胶相可容纳更大体积的水,从而有助于增加非胃肠道或皮肤用乳剂的稳定性。使用磷脂混合物增加其稳定性的液体的注射剂通常都含有溶胀的薄层状液晶^[34],而不是溶胀的凝胶相,而后者通常与控制流变学特性的方法一样,可提供由乳化蜡制备的皮肤用乳剂更好的稳定性。在皮肤和非肠胃用乳剂中双分子层凝胶和液态晶体相之间的关系已经在综述中有过讨论^[10,29]。它们结构上的许多信息是从对乳化剂相行为和水中乳剂成分的研究中得到的,这些乳剂成分是在和制剂生产、储存和使用相关的浓度和温度范围内研究的。非常有趣的是应当注意到在单乳中起作用的相同静电力、水合力和空间力在薄层相的稳定性和特性中也是起主要作用的^[35]。

3. 奥氏成熟

在乳剂中,奥氏成熟的研究没有合并研究得那么深入,虽然它是脂质和具有亚微乳滴大小的全氟化合物乳剂不稳定的主要机理,这种全氟化合物乳剂的浓缩单层并不总是乳剂稳定性所必需的^[36]。虽然表面活性剂的界面膜层可以保护不发生絮凝和合并,实际上如果表面活性剂由于增溶

的油在连续相中的扩散而超过临界胶束浓度(CMC),则奥氏成熟可能会增强。在乳剂中加入比分散相的蒸气压和溶解性更低的第三种成分,也会抑制奥氏成熟。将长链烷烃加到用十二烷基硫酸钠制备的较不稳定的水包油型乳剂中,即使烷烃不会影响到油-水界面的组成或力学特性,也能显著增加乳剂的稳定性^[37]。用作血液替代品的纯全氟萘烷乳剂,因为加入少量全氟三丁胺而提高了稳定性。有比分散相溶解性更低的疏水性辅料存在时,含有局部麻醉剂/止痛剂的脂质乳剂的稳定性得到提高^[38]。聚合物乳化剂通过增加连续相黏性来稳定乳剂,防止奥氏成熟。采用与水不混溶的油(如矿物油)制备的乳剂中,相对而言不会产生奥氏成熟,这可以部分解释为什么这些油比在注射剂中使用的更易混溶的植物油容易乳化。

4. 乳化剂的选择

这些年来已经做了很多努力去寻找从大量上市的表面活性剂中筛选出具有潜力的乳化剂的系统方法。虽然包括复杂的药学多相系统在内的控制乳剂稳定性的机制越来越清楚,但是对于特定的乳剂而言,有助于正确选择乳化剂的科学指标还很少。下面主要是基于界面考虑和乳化剂相行为的半经验方法。

4.1 亲水-亲油平衡概念

多年前,Griffin 提出了亲水-亲油平衡(HLB)的概念和它的加和性,用于非离子乳化剂的选择,这种经验方法现在还在广泛使用。Becher 对表面活性剂的 HLB 进行了综述^[39]。根据分子中亲水部分和疏水部分的相对比例,每种表面活性剂都分配给了一个 HLB 值,介于 0~20。油包水型乳剂通常采低 HLB 值的油溶性表面活性剂,水包油型乳剂多采用高 HLB 值的亲水性表面活性剂。这种选择方法是基于每种类型的油均需具有一定 HLB 值的乳化剂以生成稳定乳剂。因此油类通常被指定了一高一低两个 HLB 值,通过乳化作用分别形成油包水型和水包油型乳剂。通过考察与乳化油所需的 HLB 值接近的一系列不同 HLB 的混合乳化剂,以确定哪一个形成的是最稳定的乳剂[图1(a)]。

对处方设计者而言,虽然 HLB 概念缩小了供选择的乳化剂的范围,提供了公式计算方法,但 HLB 还是受到单个表面活性剂的分子结构的严格限制。HLB 没有考虑到整个乳剂,因此对乳剂中乳化剂成分间的相互作用、温度变化的影响或附加成分的存在不敏感。结果就是,并非所有合适 HLB 的乳化剂混合物都能形成稳定的乳剂。例如,当 HLB 值差异很大的表面活性剂混合得到一个最适的理论 HLB 时,油相和水相中高溶解度的表面活性剂改变了界面的分子平衡,就会产生不稳定的乳剂。类似的,如果加入的表面活性剂在界面形成分子间的结合,结合的复合体不可能具有那些以任何一种简单方式和组分分子特性相关的性质。

4.2 相转变温度法(HLB-温度)

Shinoda 介绍了相转变温度(PIT),作为乳化剂选择的

R

补充方法,该方法应用了乳剂的特征性质而不是纯粹的乳化剂性质^[40]。这种方法运用的原理是含有非离子型表面活性剂的水包油型乳剂的稳定性与界面膜的水合作用程度紧密相关。提高温度或加入盐类会降低乳剂的稳定性,因为这样会减少界面膜水合作用的程度。由于乳化剂具有从低温时优先水溶性向高温时优先油溶性的转变的性质,在特定温度时会发生相转变,这一温度对于特定乳剂是固定的,可通过试验测定。作为一般的规律,当乳剂的存放和使用温度在 20~65℃且低于 PIT 时,能得到相对稳定的水包油型乳剂,这可能由于此温度范围界面膜能够充分水合。因为乳剂中添加剂和组分间的相互作用影响的是 PIT 而非 HLB,具有相同 HLB 乳化剂混合物形成的乳剂具有不同的 PIT。

4.3 复乳的显微镜选择

对于采用表面活性剂和两亲物质增加复杂皮肤用乳剂稳定性的机理的更好理解,促使了一种用于评价潜在乳化剂的快速显微镜法的出现。这种方法是基于对下述现象的观察:一些优良的乳化剂混合物通过形成稳定凝胶相多层膜来稳定乳剂,其在室温下可自发膨胀,这个过程能通过显微镜进行观察。只有在加热和冷却过程后不能形成胶态或亚稳胶态的乳化剂混合物,才观察不到在室温下的自发膨胀^[4]。

5. 乳化技术

乳剂通常是运用大幅度搅拌技术产生的机械能来制备的。无论是层流的剪切力还是湍流的惯性力都能破坏乳滴。乳化装置从简单的人工混合和搅拌器,到螺旋桨或涡轮混合器、静态混合器、胶体磨、高速匀质机和超声波装置都已经使用过。

乳化剂在乳化过程中也起重要作用。在乳化过程中,表面活性剂降低界面张力,使乳滴更易于分裂,同样也降低了乳滴再结合的趋势。其他乳化剂,如聚合物大分子,在搅拌过程中由于流变学特性的影响会改变流体动力。从实验室到生产的放大过程可能会由于难以配备精密的混合条件而导致很多问题。而且由于残存空气的原因,特别是有塑变值的高稠度乳剂,除了外观不佳外,甚至微量的空气也会引起易氧化药物或赋形剂的降解。

当生产非肠胃乳剂时就会有额外的限制,这些乳剂必须是灭菌的并且具有细微粒径。全氟化合物和脂肪乳剂通常在高温高压下乳匀制得,因为这需要大量能量的输出来产生比 1μm 小得多的乳滴。虽然高温灭菌被广泛使用,但还是需要对稳定性进行严格的测试,而乳剂有时可在严格的无菌条件下由灭过菌的成分制得并且还需经过滤进一步除菌^[16]。

工艺变量

加热和冷却周期的速度、混合的程度和次序不同,会引起生成乳剂的稠度和流变学的变化。乳剂最初的微粒大

小取决于使用的乳化剂、乳化设备、加入速度和相体积。如果乳化前将表面活性剂置于一相中,它将扩展到另一个相中以达到平衡。因此,乳化温度和冷却速度是重要的,而混合的时间应当足够充分以使表面活性剂在整个过程中在界面迁移和平衡。有时候水包油乳剂通过相转变技术制备,这种技术中先将水相加到油相中,形成油包水乳剂,然后再加入更多量的水相使其转变成水包油乳剂。通常认为这种过程可以制备更好的乳剂。

制备技术对由非离子型乳化蜡制备的乳剂的初始和最终稠度有显著的影响,尤其是冷却速度和混合程序。例如,“突然”降温和快速混合形成的是非常易变的系统,而缓慢降温和充分的混合就会产生半固体乳剂。当乳化剂在熔化状态时,混合时间会影响表面活性剂在熔融体和双分子层的分布以及系统中相关薄层的次序。使用离子型乳化蜡,不同的制备技术只使最终产品的稠度产生相当小的变化。这种不同不是因为阳离子三相系统的凝胶相组成,而是因为形成乳剂后析出的结晶醇大小不同。通过快速冷却法形成的系统是较小但数量众多的十六醇十八醇混合物的晶体,而且该系统比通过更长工序生产的类似三相系统要更稠^[29]。

微乳

微乳属于热力学稳定的透明(或半透明)的油水分散体,通过表面活性剂分子形成的界面膜使其稳定。表面活性剂可以是单一的,也可以是混合的,或者是和辅助表面活性剂一起合用的,如中等链长的醇(丁醇,戊醇)。在微乳的制备过程中表面活性剂浓度和油水比例(20%~80%)变化较大,形成的均质体系都是低黏度液体。

微乳这一术语暗示其与普通乳剂之间紧密的关系,其实这是一种误解,因为微乳中包含了大量不同的微结构,其中很多与普通乳剂是不一样的。虽然微乳是由油和水的分散乳滴组成的,但是现在认为微乳是基本稳定的单相溶胀胶束溶液,而非不稳定的两相分散体。微乳因其透明、低黏性和更重要的是它的热力学稳定性以及能自发形成的能力而容易与普通乳相区别。虽然微乳极易变化,微乳乳滴会在几分之一秒内消失,同时其他乳滴又会在体系中的其他地方自发形成,但还是很难界定膨胀胶束的粒径(10~140nm)和细小乳滴的粒径(100~600nm)之间的区别;相反,普通乳剂的乳滴尽管小,但它们是以单个实体形式存在的,直到发生合并或奥氏成熟。

图 5 显示的是假想的典型微乳结构的相图。在水浓度高的区域,微乳由分散在水中的小油滴组成(o/w 微乳),而在水浓度低的区域则情况相反,微乳由分散在油相中的水滴组成(w/o 微乳)。在每个相中,油和水滴被表面活性剂膜分开。在等量油水两相体系中,形成均衡的双连续结构,该结构中油和水以更复杂的形式相互渗透。在这个区域,油相和水相区无数弯曲的通道延伸到宏观距离,同时表面活性剂形成曲率快速变动的界面,但是其中净曲率

接近于零。

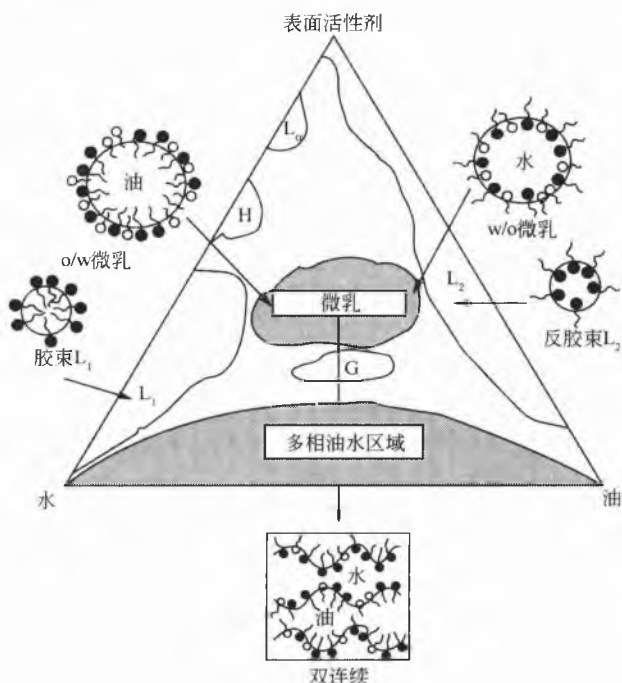


图5 用不同结构的图示表示胶束、微乳和多相乳剂的油、水及表面活性剂混合物的三元相图

1. 微乳在药学和生物学上的应用

微乳有超低界面张力和较大的界面面积，具有在同一各向同性介质中浓缩和增溶大量油溶性和水溶性物质的能力。如同 Eccleston 的综述一样，多年以来，研究重点集中在广泛用作化学、生物化学、光化学反应中新型反应介质，以及作为化学物质和小颗粒的载体上^[41]。油包水型反相微乳是一项特别有趣的课题，因为其在水中可以溶解酶而又不使酶变性和失活，故很快就在生物工程上得以应用。这种增溶的亲水性酶转化成可溶于有机相的疏水性物质的能力，最终可合成新药。与普通乳剂相比，微乳促进了肠胃吸收。在给药方面，微乳也有许多其他优点。微乳无需借助高速剪切设备或有效的加热而自发形成（加热和温和的搅拌仅在融化某些成分时需要），并且它们的显微结构不受其他赋形剂加入顺序的影响。微乳的透光性和低黏度保证其外表美观，易于处理和包装，而其长期的稳定使其有较长的保质期。因此，微乳作为潜在的给药系统吸引了很多人的兴趣。无论是水包油还是油包水乳剂，均可增加药物的口服生物利用度，包括各种多肽^[42]。目前 Novartis 公司生产的口服的环孢霉素浓缩液（Sandimmune Neoral®）已经上市，它可以在肠胃道的水中形成微乳。在这种制剂中，环孢霉素的吸收速度比普通油性分散体要快，而且变化较少。以中等链长甘油三酯制备的油包水型微乳，其水相钙黄绿素给药后在十二指肠的血药浓度比水溶液制剂要高很多^[43]。

微乳还用于局部给药以提高药物吸收。例如，常用作洗剂和乳膏剂乳化剂的鲸蜡醇，作为微乳的组成成分后，能更快、更深层地吸收进入皮肤^[44]。虽然有效的皮肤渗透对药物来说是理想的，但是在这些制剂中相对高浓度的表面活性剂（10%~25%）和辅助表面活性剂或助溶剂（5%~10%）也能提高潜在刺激物或致癌物的吸收。实际上作为药物给药系统，在认识微乳所有潜力上，主要限制是表面活性剂、辅助表面活性剂、溶剂和其他可以接受的药用材料的选择范围窄。

2. 微乳的形成

已经使用了许多方法来研究微乳形成和稳定机制（由 Eccleston^[41]和 Attwood^[45]总结）。早期的理论仅考虑微乳的界面，但不能区分热力学稳定和微细的动力学稳定的乳剂。对于自发形成的微乳，当界面面积增大，涉及的自由能 ΔG ($\Delta G = \gamma \Delta A$, ΔA 是界面面积的增加值) 是负值。由于界面膜油相和水相之间的界面张力 γ 减小到一个非常低的值，产生了一个小但为正值自由能，这是必要条件。乳滴在连续相中的分散增加了系统的熵值。微乳的形成是由于在连续相中乳滴分散的熵值克服了小的界面张力和大的界面面积 A 的正产物，从而改变了负值自由能。

微乳中油-水界面的曲率会从朝向油（水包油）或朝向水（油包水）高弯曲率向零平均曲率的双连续结构变化。微乳形成的类型有赖于表面活性剂、辅助表面活性剂和油相的性质。虽然没有严格的选择适当的微乳成分的规律，但是有许多基于经验观察的一般方法。对于特定油相，表面活性剂的选择必须是：

(1) 在制备微乳的过程中，将界面张力降低到一个很低的值以促进分散过程。

(2) 表面活性剂要有适当的亲水亲油性质，能提供界面区域适当的曲率以形成想要的微乳类型，o/w, w/o 或双连续相。

(3) 表面活性剂能提供可变的薄膜，能容易地使圆形小乳滴变形。

Mitchell 和 Ninham 分析解释了表面活性剂联合形成界面膜曲率导致微乳的形成。他们用 V/al 定义的包封率 P ，其中 V 是表面活性剂的偏摩尔体积、 a 是表面活性剂头部相交区域的面积（即大小）、 l 是表面活性剂链长的最大值^[46]。包封率提供了 HLB 的直接计量单位，并受相同因素的影响。如果表面活性剂的有效极性部分比疏水性部分多，则有利于形成水包油型微乳， P 在 0~1 变化，界面自然向水相弯曲（正曲率）。当界面向相反的方向弯曲则形成油包水型微乳，这时 $P > 1$ （负曲率）。在零曲率时，HLB 处于平衡， $P=0$ ，双连续相或层状结构都可以形成，这取决于薄膜的刚性。临界包封参数 P 只是单纯基于几何学的考虑。表面活性剂头部的水合作用、油相的渗透作用以及表面活性剂薄膜中的辅助表面活性剂都能影响包封和曲率，就如表 5 所总结的一样，表 5 也说明了怎样改变处方来制备所需的微乳类型^[47]。

R

大部分的单链表面活性剂不能有效地降低油-水界面张力以形成微乳,它们也不具有真正的分子结构,必须以短链或中等链长的醇类作为辅助表面活性剂。辅助表面活性剂插到表面活性剂分子间,减少极性头基之间和烃链之间的相互作用,确保界面膜的可变形性,足以使每个乳滴变形的中等链长的醇类(如戊醇和己醇)作为特别有效的辅助表面活性剂被很多研究者使用。然而它们刺激性大而不适宜于药用。双链表面活性剂如阴离子 Aerosol-OT(二辛基琥珀酸磺酸钠)或阳离子 DDAB(二甲基二烷基溴化铵盐),具有相对较小的头基和较大的疏水性部分,具有可自发形成 w/o 型微乳所需的 HLB 值,不需要辅助表面活性剂。但不幸的是,这些广泛研究过的表面活性剂毒性太大,不能在通常的药学和生物工程中使用。双链磷脂如卵磷脂的磷脂酰胆碱有明显的利用可能。虽然卵磷脂太过亲脂以至于不能形成微乳,但是药用微乳可采用双链磷脂、药用的辅助表面活性剂(如乙醇、丙醇或 *n*-丁醇和肉豆蔻酸异丙酯)制备而成^[48,51]。自乳化药物给药系统是由甘油三酯油相和表面活性剂混合物组成,当和水混合后发生自发乳化^[52]。上市产品 Sandimmune Neoral[®] 就是利用这种原理的,它被胃液在体稀释形成微乳。

表 5 影响单分子层膜自发弯曲的因素^[47]

变 量	曲率影响	原 因
增加油的链长	正	表面活性剂尾部区域的渗透减少
加入较短链的辅助表面活性剂	正	醇溶胀头部区域比尾部区域更多
加入较长链的辅助表面活性剂	负	醇溶胀表面活性剂链部比头部更多
加入盐(离子型表面活性剂)	负	掩蔽极性头部基团间的排斥
加入盐(非离子型表面活性剂)	负	脱水作用减小了头部基团尺寸
加入支链或双链的表面活性剂	负	增加尾部基团面积
减小表面活性剂头部基团尺寸	负	
增加温度(非离子型表面活性剂)	负	脱水作用减小了头部基团尺寸
增加温度(离子型表面活性剂)	正	增加表面活性剂相反离子的分离

3. 微乳的处方和制备

微乳是热力学稳定的,仅通过温和搅拌混合油相、水相、表面活性剂和辅助表面活性剂来制备。一旦选择了适当的微乳成分,就可建立四元相图或伪三元相图来明确微乳的区域和性质及其周围两相和三相的区域。微乳区能通过光、中子和 X 射线及其他技术手段(如 NMR 和显微镜等)方法进行鉴别和表征^[45]。由于乳滴间的相互作用,在乳滴体积占大部分的体系中数据的解释会产生问题。研究相对浓度低的体系和外推到零浓度以消除粒子间相互作用

用的常规方法,不适用于微乳,因为稀释体系将影响其结构。Percus 和 Yevick 采用的硬球体模型已经能成功地用于分析浓缩的 w/o 型微乳^[53]。

参 考 文 献

1. International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC. Manual of Colloid and Surface Chemistry; Butterworths; London, 1971.
2. Garti, N.; Aserin, A. Double Emulsions Stabilized by Macromolecular Surfactants. Micelles Microemulsions and Monolayers; Shah, D. O. Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1998; 333—362.
3. Davis, S. S.; Washington, C.; West, P.; Illum, L.; Liversidge, G.; Sternson, L.; Kirsh, R. Lipid Emulsions as Drug Delivery Systems. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1987, 507, 75—88.
4. Eccleston, G. M.; Emulsions. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 1st Ed.; Swarbrick, J., Boylan, J. C. Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1992; 5, 137—188.
5. Block, L. H. Pharmaceutical Emulsions and Microemulsions. Pharmaceutical Dosage Forms; Disperse Systems; Lieberman, H. A., Rieger, M. M., Banker, G. S., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1996; 2, 47—109.
6. Rosoff, M.; Specialised Pharmaceutical Emulsions. Pharmaceutical Dosage Forms; Disperse Systems; Lieberman, H. A., Rieger, M. M., Banker, G. S., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1997; 3, 1—22.
7. Barry, B. W. Dermatological Formulation. Percutaneous Absorption; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1983; 480.
8. Flynn, G. L.; Cutaneous and Transdermal Delivery; Processes and Systems of Delivery. Modern Pharmaceutics, 3rd Ed.; Banker, G. S., Rhodes, C. T. Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1996; 239—298.
9. Eccleston, G. M.; The Microstructure of Semisolid Creams. Pharm. Int. 1986, 7 (3), 63—70.
10. Eccleston, G. M.; Functions of Mixed Emulsifiers and Emulsifying Waxes in Dermatological Lotions and Creams. Colloids and Surfaces 1997, 169—182.
11. Amselem, S.; Friedman, D.; Submicron Emulsions as Drug Carriers for Topical Administration. Submicron Emulsions in Drug Delivery; Benita, S. Ed.; Harwood Academic; Amsterdam, 1998; 9, 152—173.
12. Carrigan, P.; Bates, T.; Biopharmaceutics of Drug Administered in Lipid-Containing Dosage Forms 1; GI Absorption of Griseofulvin from an Oil-in-Water Emulsion in Rat. J. Pharm. Sci. 1973, 62 (9), 1476—1479.
13. Collins Gold, L. C.; Lyons, R. T.; Bartholow, L. C.;

- Parenteral Emulsions for Drug Delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* 1990, 5, 189—208.
14. Prankerd, R. J.; Stella, V. J.; The Use of Oil-In-Water Emulsions as a Vehicle for Parenteral Administration. *J. Parent. Sci. Technol.* 1990, 44, 139—149.
 15. Floyd, A. G.; Jain, S. Injectable Emulsions and Suspensions. *Pharmaceutical Dosage Forms; Disperse Systems*; Lieberman, H. A., Rieger, M. M., Banker, G. S., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1996; 2, 261—318.
 16. Nomura, T.; Koreeda, N.; Yamashita, F.; Takakura, Y.; Hashida, M. Effect of Particle Size on the Disposition of Lipid Carriers after Intratumoral Injection into Tissue Isolated Tumors. *Pharm. Res.* 1998, 15 (1), 128—132.
 17. Omotosho, J. A.; Whateley, T. L.; Florence, A. T. Release of 5-Fluorouracil from Intramuscular W/O/W Multiple Emulsions. *Biopharm. and Drug Disposit* 1989, 10, 257—268.
 18. Von Dardel, O.; Mebius, C.; Mossberg, T.; Svensson, B. Fat Emulsion as a Vehicle for Diazepam. A Study of 9492 Patients. *Br. J. Anaesth.* 1983, 55, 41—47.
 19. Lovell, M. W.; Johnson, H. W.; Hui, H. W.; Cannon, J. B.; Gupta, P. K.; Hsu, C. C. Less Painful Emulsion Formulations for Intravenous Administration of Clarithromycin. *Int. J. Pharm.* 1994, 109, 45—57.
 20. Kirsh, R.; Goldstein, R.; Tarloff, J.; Parris, D.; Hook, J.; Hanna, N.; Bugelski, P.; Poste, G. J. An Emulsion Formulation of Amphotericin B Improves the Therapeutic Index when Treating Systemic Murine Candidiasis. *Infect. Dis.* 1988, 158, 1065—1070.
 21. Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery. *Drug Targeting and Delivery*; Benita, S., Ed.; Harwood Academic: Amsterdam, 1998; 333.
 22. Spahn, D. R. Current Status Of Artificial Oxygen Carriers. *Adv. Drug Del. Rev.* 2000, 40, 143—151.
 23. Naveh, N.; Muchtar, S.; Benita, S. Pilocarpine Incorporated into a Submicron Emulsion Vehicle Causes Unexpectedly Prolonged Ocular Hypotensive Effects in Rabbits. *J. Ocular Pharmacol.* 1994, 10 (3), 509—520.
 24. Kararli, T. T.; Needham, T. E.; Schoenhard, G.; Baron, D. A.; Schmidt, R. E.; Katz, B.; Belonio, B. Enhancement of Nasal Delivery of a Renin Inhibitor in the Rat Using Emulsion Formulations. *Pharm. Res.* 1992, 9, 1024—1028.
 25. Aikawa, K.; Matsumoto, K.; Uda, H.; Tanaka, S.; Shimamura, H.; Aramaki, Y.; Ysuchiya, S. Prolonged Release of Drug from O/W Emulsion and Residence in Rat Nasal Cavity. *Pharm. Dev. Technol.* 1998, 3 (4), 461—469.
 26. Mitra, R.; Pezron, I.; Chu, W. A.; Mitra, A. K. Lipid Emulsions as Vehicles for Enhanced Nasal Delivery of Insulin. *Int. J. Pharm.* 2000, 205 (1—2), 127—134.
 27. Mascioli, E. A.; Babayan, V. K.; Bistran, B. R.; Blackburn, G. L. Novel Triglycerides for Special Medical Purposes. *J. Parent. Ent. Nut.* 1989, 12 (6), 127S—132S.
 28. Hedeman, H.; Brondsted, H.; Mullertz, A.; Frokjaer, S. Fat Emulsions Based on Structured Lipids (1, 3 Specific Triglycerides): An Investigation of the In Vivo Fate. *Pharm. Res.* 1996, 13 (5), 725—733.
 29. Eccleston, G. M. Multiple-Phase Oil-in-Water Emulsions. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1990, 41, 1—22.
 30. Nishikawa, M.; Yoshinobu, T.; Hashida, M. Biofate of Fat Emulsions. *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery*; Benita, S., Ed.; Harwood Academic: Amsterdam, 1998; 99—118.
 31. Eccleston, G. M.; Florence, A. T. Application of Emulsion Theory to Complex and Real Systems. *Int. J. Cosmet. Sci.* 1985, 7, 195—212.
 32. Hough, D. B.; Thompson, L. Effect of Nonionic Surfactants on the Stability of Dispersions. *Nonionic Surfactants. Physical Chemistry*; Schick, M. J., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987; 601—676.
 33. Washington, C. The Electrokinetic Properties of Phospholipid Stabilized Fat Emulsions. III. Interdroplet Potentials and Stability Ratios in Monovalent Electrolytes. *Int. J. Pharm.* 1990, 64, 67—73.
 34. Rydhag, L.; Wilton, I. The Function of Phospholipids of Soybean Lecithin in Emulsions. *Am. J. Oil Col. Chem.* 1981, 58, 830—837.
 35. Eccleston, G. M.; Behan-Martin, M. K.; Jones, G. R.; Townes-Andrews, E. Synchrotron X-Ray Investigations into the Lamellar Gel Phase Formed in Pharmaceutical Creams Prepared with Cetrimide and Fatty Alcohols. *Int. J. Pharm.* 2000, 203, 127—139.
 36. Buscall, R.; Davis, S. S.; Potts, D. C. The Effect of Long-Chain Alkenes on the Stability of Oil-in-Water Emulsions. The Significance of Ostwald Ripening. *Colloid Polym. Sci.* 1979, 257, 636—644.
 37. Davis, S. S.; Round, H. P.; Purewal, T. S. Ostwald Ripening and the Stability of Emulsion Systems: An Explanation for the Effect of an Added Third Component. *J. Colloid Int. Sci.* 1981, 80 (2), 508—511.
 38. Welin-Berger, K.; Bergenstahl, B. Inhibition of Ostwald Ripening in Local Anaesthetic Emulsions by Using Hydrophobic Excipients in the Disperse Phase. *Int. J.*

R

- Pharm. 2000, 200 (2), 249—260.
39. Becher, P. Hydrophile-Lipophile Balance; An Updated Biography. Encyclopedia of Emulsion Technology; Becher, P., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1985; 2, 425—512.
 40. Shinoda, K.; Saito, H. The Stability of O/W Type Emulsions as Functions of Temperature and the HLB of Emulsifiers; The Emulsification by PIT Method. J. Colloid Int. Sci. 1969, 30, 258—263.
 41. Eccleston, G. M. Microemulsions. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 1st Ed.; Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1995; 9, 375—421.
 42. Ritschel, W. Microemulsions for Improved Peptide Absorption from the Gastrointestinal Tract. Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol. 1991, 13, 205—220.
 43. Constantinides, P. P.; Scalart, J.; Lancaster, C.; Marcello, J.; Marks, G.; Ellens, H.; Smith, P. L. Formulation and Intestinal Absorption Enhancement Evaluation of Water-In-Oil Microemulsions Incorporating Medium Chain Triglycerides. Pharm. Res. 1994, 11 (10), 1385—1390.
 44. Linn, E. E.; Pohland, R. C.; Byrd, T. K. Microemulsions for Intradermal Delivery of Cetyl Alcohol and Octyl Dimethyl PABA. Drug Dev. Ind. Pharm. 1990, 16 (9), 899—920.
 45. Attwood, D. Microemulsions. Colloidal Drug Delivery Systems; Kreuter, J., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1994; 66, 31—71.
 46. Mitchell, D. J.; Ninham, B. Micelles Vesicles and Microemulsions. J. Chem Soc. Faraday Trans. 1981, 2 (677), 601—629.
 47. Fletcher, D. I.; Parrott, D. Protein Partitioning between Microemulsion Phases and Conjugate Aqueous Phases. Structure and Reactivity in Reverse Micelles; Pileni, M. P., Ed.; Elsevier: New York, 1988; 303—322.
 48. Attwood, D.; Mallon, C.; Taylor, C. J. Phase Studies on Oil-in-Water Phospholipid Microemulsions. Int. J. Pharm. 1992, 84, R5—R8.
 49. Aboofazeli, R.; Lawrence, M. J. Investigations into the Formation and Characterisation of Phospholipid Microemulsions. 1. Pseudo-ternary Phase Diagrams of Systems Containing Water-Lecithin-Alcohol-Isopropyl Myristate. Int. J. Pharm. 1993, 93, 161—175.
 50. Aboofazeli, R.; Lawrence, M. J. Investigations into the Formation and Characterisation of Phospholipid Microemulsions. II. Pseudo-Ternary Phase Diagrams of Systems Containing Water-Lecithin-Isopropyl Myristate-Alcohol; Influence of Purity. Int. J. Pharm. 1994, 106, 51—61.
 51. Aboofazeli, R.; Lawrence, M. J. Investigations into the Formation and Characterisation of Phospholipid Microemulsions. II. Pseudo-Ternary Phase Diagrams of Systems Containing Water-Lecithin-Isopropyl Myristate. Int. J. Pharm. 1994, 111, 63—72.
 52. Pouton, C. Lipid Formulations for Oral Administration of Drugs: Non-Emulsifying, Self-Emulsifying and Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems. Eur. J. Pharm. Sci. 2000, 1 (11), S93—S98.
 53. Percus, J. K.; Yevick, G. J. Analysis of Classical Statistical Mechanics by Means of Collective Co-ordinates. Phys. Rev. 1958, 110, 1—13.

(吴晓盈 梁瀚森 译)

软胶囊

David H. Bergstrom

R. P. Waranis

M. S. Rahman

Cardinal Health Pharmaceutical Technologies & Services Center, Somerset, New Jersey, U. S. A.

J. C. Ferdinando

R. P. Scherer Limited, Swindon, United Kingdom

引言

软质明胶胶囊（也称软质弹性明胶胶囊、Liqui-gels®或软胶囊）是一种独特的药物传输系统，它与传统剂型如片剂、硬胶囊、液体制剂相比，具有明显的优势。然而由于经济上、技术上和专利方面的限制，目前世界上软胶囊的生产商仍相对较少^[1]。

软胶囊的主要优点包括：

- 改善生物利用度（增加药物吸收^[2]）。
 - 加速产品开发。
 - 增加药物稳定性（可防止氧化、光降解以及亲脂体系中的水解）。
 - 患者依从性好/消费者亲和度高（易于吞服、美观、无异味、方便）及产品美观。
 - 剂量均匀性好（对于溶液填充物来说少于±1%，对于混悬填充物来说少于±1%~3%）。
 - 较好的填充外观（填充时的夯实过程易产生小孔或可见的裂隙）。
 - 对于高效或细胞毒药物来说操作安全性更高。
 - 产品易区分（通过对新颖形状、颜色和大小选用）。
 - 极好的产品生命周期管理。
- 相比之下，软胶囊的缺点相对较少，主要包括：
- 需要有专门生产设备。
 - 与片剂相比，生产成本更高。
 - 技术专家较缺乏。

经调查，与各类剂型相比较，软胶囊被评为最受消费者欢迎的高技术含量剂型之一。其制备、填充以及密封是一次完成的，而且一旦产品开始生产，整个过程就将 24h 连续运转直至完成批生产。这就需要有一个可以连续生产的环境。

软胶囊很容易制成各种形状。用于口服药品的标准软胶囊形状一般为椭圆形、长条形和圆形。最近的调查发现，在每种形状种类中，小体积的软胶囊更受欢迎，而且椭圆形是最受欢迎的。

外观

软胶囊（图 1）是一种内充液体或半固体的密封单构件

胶囊。软胶囊含有两种主要成分：明胶壳和填充物（图 2）。在成品中，明胶壳主要由明胶、增塑剂和水组成；填充材料包括各种介质，可以是药物的溶液，也可以是混悬液。软胶囊可以用合适的肠溶材料如邻苯二甲酸醋酸纤维素等来包衣，以达到在肠内释放药物的目的。



图 1 软胶囊的例子

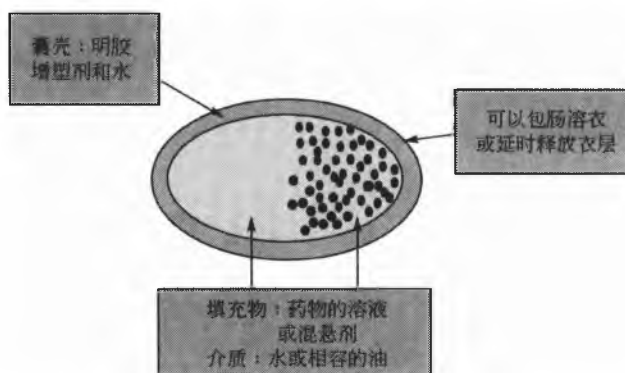


图 2 软胶囊构造

由于其特殊的性质和优势，软胶囊广泛用于许多药品、化妆品和营养品中。在制药方面的主要应用有口服剂型、可咀嚼软胶囊、栓剂和局部用产品。软胶囊的大小是以代表额定容量的量滴（容量单位，1mL=16.23 量滴）来表示。例如，一个 11 号长条形软胶囊可充填 8.5~11.0 量滴的内容物。

R

剂型开发

选择了软胶囊作为药物的剂型后,所期望的性能特征将影响处方开发。首要考虑的是含药物溶液的软胶囊是否透明,或者含药物混悬液的软胶囊是否不透明;其次,要决定该处方是否与其他产品生物等效,或者有更强的体内作用(比如,更快或更完全地吸收)。本节将讨论软胶囊的处方设计原理,包括明胶囊壳和填充物的处方。

1. 明胶囊壳的配方

典型的软胶囊壳是由明胶、增塑剂、水、着色剂和(或)遮光剂组成,有时还含有芳香剂和(或)防腐剂。下面详述最常用囊材的功能、种类和用量。

1.1 明胶

明胶提供了软胶囊壳的结构支持,它通常占湿胶处方的40%~50%,可以是A型明胶(酸处理)或B型明胶(碱处理)。明胶种类的选择是基于它与软胶囊中其他活性和非活性成分的相容性。明胶的生产步骤包括提取、中和、干燥和研磨^[3],其理化性质很大程度上由胶原的来源、提取方法、pH、受热过程和电解质含量决定。

1.2 增塑剂

增塑剂可使囊壳可塑和有弹性。如不考虑填充物的影响,增塑剂与明胶的用量比决定了囊壳的硬度。增塑剂一般占湿胶处方的20%~30%,常为甘油、山梨醇或丙二醇,或它们的混合物,混合糖与山梨醇酐的几种混合物作为专利产品也能使用,可从辅料生产商处获得^[4,5]。增塑剂的选择和用量有助于决定最终产品的硬度,也会影响软胶囊的溶出和崩解以及它的理化稳定性。增塑剂的选择是基于它与填充物的相容性、干燥处理时间以及期望的最终软胶囊的性质(包括硬度、外观、加工性质、稳定性,甚至产品将销售的地理位置)。

1.3 水

水通常占湿胶处方的30%~40%,它对于明胶的制备和软胶囊的成形过程很重要。包囊之后,过量的水分通过控制干燥从软胶囊中去除,最终平衡水分应低于10%。

1.4 着色剂/遮光剂

在湿胶处方中往往使用低浓度的着色剂和遮光剂。多种着色剂(如FD&C和D&C水溶性染料、经批准的胭脂红、色素和蔬菜色素)常单独或合并加入明胶囊壳中来产生期望的颜色、色泽和色调,以利于产品辨认。在着色剂选用上一条通用的规则是囊壳的颜色应该和内容物颜色接近或更深。

遮光剂有时添加到明胶囊壳中以使得填充混悬液的软胶囊不透明,或者保护光敏感性填充物。二氧化钛是最常

用的遮光剂。芳香剂如乙基香兰素和精油有时也加入囊壳内以产生期望的香味,掩盖软胶囊本身的异味。

2. 填充物的处方

由于包囊过程中及之后软胶囊组分(水、增塑剂、药物等)可能发生迁移,为了保证产品质量,填充物的制备必须和囊壳的制备同时进行,否则很容易出现问题。

填充物的黏度从流动液体到稠厚的混悬液或糊状物均可。软明胶胶囊中的填充材料可以是液体、液态固体溶液或混悬液。这些配方的设计目标是生产出具有较好理化稳定性、疗效及生产效率且尽可能小的胶囊。

能装入软胶囊的液体分为两类:与水易混合的液体和不易与水混合的液体^[6]。

易与水混合的液体包括PEG和非离子型表面活性剂,如聚山梨酯。低相对分子质量的PEG如PEG 400最常用,因为它们室温下仍为液态。少量(5%~10%)的其他易与水混合的液体如丙二醇、乙醇和甘油也可使用。

不易与水混合的液体包括植物油和芳香油、脂肪族化合物、芳香及氯代碳氢化合物、醚、酯、高分子有机酸以及某些醇类。

低相对分子质量水溶性及挥发性的有机化合物如一些醇、酸、酮和醚,以及水(5%以上)、乳液(油包水或水包油)、有极端pH的液体和醛类,有可能在灌胶囊后引起问题。

不易溶于溶剂或混合溶剂的药物可制成混悬液后灌入胶囊。不溶性药物颗粒的粒径应能过80目或更细的筛以保证最大限度的混悬均匀性及满足胶囊灌装设备的需要。混悬剂有石蜡、蜂蜡、用于油性介质的氢化植物油以及用于非油性介质的固体乙二醇酯(如高相对分子质量PEG)。在分散体系中加入表面活性剂(如聚山梨酯)可以提高其成分的润湿性和(或)填充物在体内的分散性。

总之,许多不同的材料均可灌胶囊。但是由于高水溶性和(或)固有的化学反应活性及与囊壳的反应,对某些化合物来说,仍然存在限制。这些化合物包括强酸、强碱以及它们的盐和铵盐。某些化合物如醛类能与明胶发生反应,引起交联,或生成一种无生物利用度的产物。另外,一些在潮湿环境中不稳定的物质(如阿司匹林)在软胶囊中也会有不良的化学稳定性。

产品开发

本节将讨论软胶囊产品开发的基本原理,包括溶解度筛选、凝胶的相容性、工艺开发和试验性小批量生产,并就生产工艺和处方研究改善药物动力学的行为加以综述。

图3详述了软胶囊开发的流程图,下面描述其中的主要步骤。

开发内灌溶液软胶囊的第一步是确定药物在一系列药用溶剂中的溶解性。测定好溶解度以后,接着根据法规上可接受的程度和已知的与软胶囊剂型的相容性来选择溶剂。这些辅料通常包括:

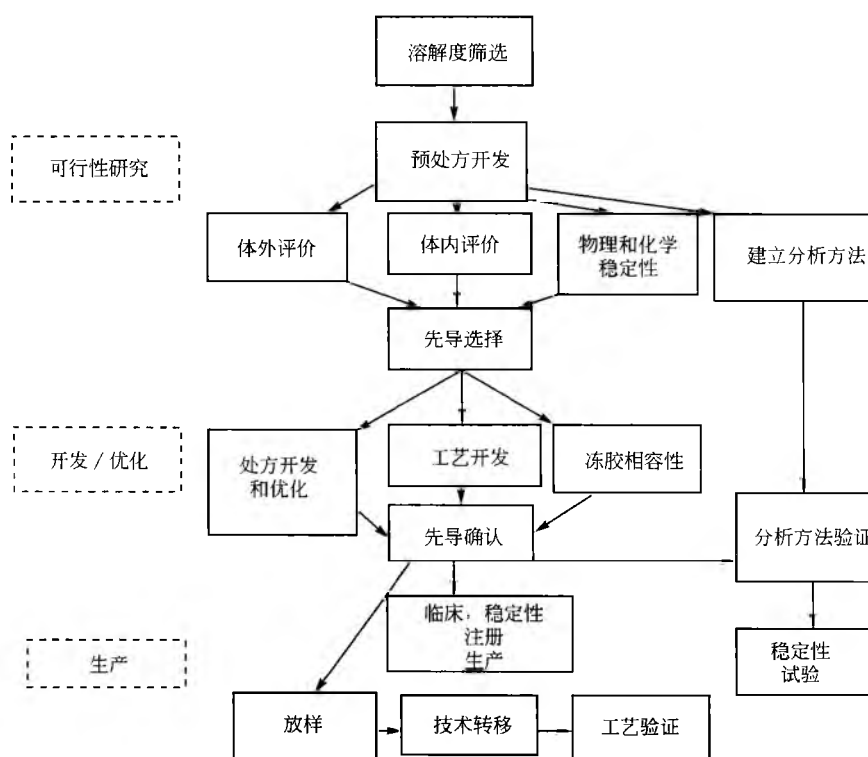


图3 典型的软胶囊开发流程图

- 亲水性溶剂。
- 亲脂性物质。
- 亲水性表面活性剂。
- 亲脂性表面活性剂。
- 混合溶剂。

应选用对药物有足够溶解性的溶剂，虽然有必要同时考虑达到期望的体内外特性并保证良好的物理稳定性。除了考察初步处方的体内外行为，评估以下条件中药物在混合体系中的溶解度也很重要：

- 加速条件下的物理稳定性。
- 加速条件下的化学稳定性。
- 赋形剂的相容性。

对于含有混悬液填充物的软胶囊，仍需测定药物在一系列药用溶剂中的溶解度，接着选择对药物溶解度很小或者不溶的辅料。这种处方往往需要添加增黏剂以便在生产过程中为药物提供足够的混悬特性，这对于生产时维持药物的均匀性很重要。应对增黏剂的种类及用量进行优化以最有利于生产。

1. 冻胶相容性

对填充物和囊壳的冻胶相容性的全面测定是开发过程中的重要一环。如果填充物与囊壳处方不相适应，会引起很多问题。这些问题在灌胶囊后可以立即出现，或者经长期储存后才出现。

2. 生产工艺开发/试验性生产

在实验室选定填充物和囊壳的配方后，应开发一套合适的生产工艺以制备试验性小批量产品供注册及临床研究。这个生产工艺的开发主要包括几个工艺参数（如加料顺序、

温度、混合条件和设备）的选择和确认。

选择进行稳定性和临床评价的处方应制备成试验性的批量。制备时，应评价生产工艺及产品，以便为后续的工艺参数范围和验证研究提供有价值的信息。比如，填充物的水分和胶囊的硬度在干燥过程中应加以监控，以优化干燥过程和最终产品的稳定性。图4是一种软胶囊产品的干燥曲线。请注意，填充物水分的降低伴随着囊壳硬度的增大。

内容物和囊壳在干燥过程中的改变
亲水性处方

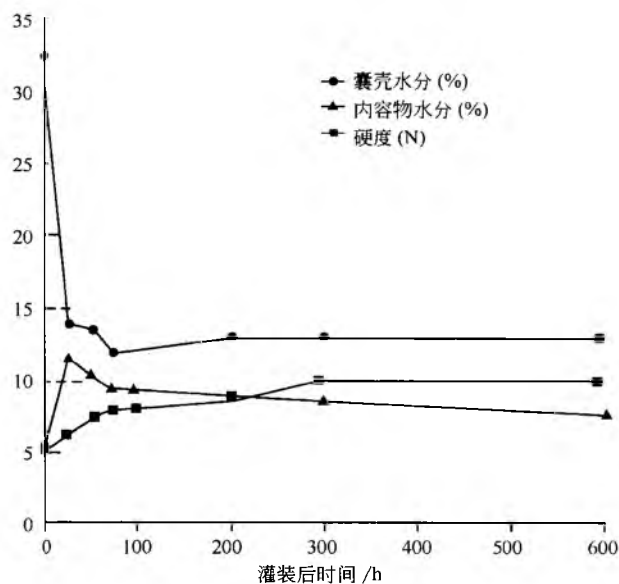


图4 典型的干燥曲线

R

生产方法

早在 19 世纪 30 年代,软胶囊就被用作一种药物输送方法。早期的生产包括手蘸法和板压法。用手蘸法制出一个一个空的软胶囊壳随后可用注射器或滴头填充空胶囊壳。板压法是一种批量生产工艺,它是用两个模具把两片湿明胶压在一起。两块模具使得明胶壳内形成真空,而后活性填充物加入其中。第二片明胶壳置于第一片之上,将两者挤压,使填充物如三明治般夹在其间。模板的压力使得明胶上下紧密黏合,然后一个个的软胶囊被切割下来以便后续干燥。

现在市面上的每一种软胶囊几乎都是用 Scherer 1933 年申请专利的转模工艺制得的^[7]。这些年来,设备和生产

工艺都得到了显著改进,但基本的制备原理却没有改变。在这种方法中有两道独立的工序是生产两种不同东西(它们常常同时进行):明胶冻胶和填充物。在灌胶囊的工序中,它们合并用于制备湿的软胶囊。

湿的明胶冻胶是将明胶囊壳成分(明胶、增塑剂、水、着色剂/遮光剂、芳香剂和防腐剂)混合,并在真空条件下熔融制得。在胶囊灌装机器中(图 5),熔融的冻胶流经热的输送管,浇铸在冷的鼓形圆筒上,形成两道大约 6in 宽的条状物,它的厚度(通常是 0.02~0.04in)要严格控制,并在生产过程全程做周期性检查。冻胶条横穿过滚轮,以提供合适的条排列,并使其正反两面都涂上润滑剂。每条冻胶条形成半个软胶囊。用两种不同颜色的冻胶条能制成双色的软胶囊。

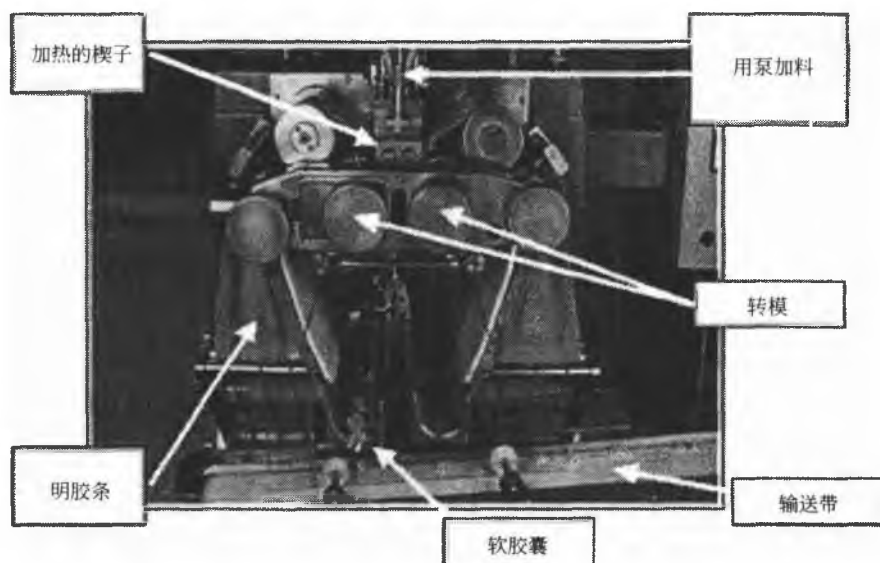


图 5 软胶囊灌装设备

活性填充物在一个独立于冻胶制备的工序中制得。所有填充物的黏度及混悬颗粒的粒径是开发时所确定的并在生产过程中全程监控的重要参数。

用两条冻胶和填充物,在该工艺的胶囊化过程中软胶囊就制成了。润滑过的冻胶条进入一对反转的模具中,模具表面含有大小和形状对应的凹陷,就形成了制备软胶囊的模型,而且模具的凹陷密封软胶囊的两面。这样,制得的软胶囊就能被从残余的冻胶条上切割下来。图 6 显示了灌装好的软胶囊刚从条上分离下来。之后,软胶囊被输送到翻滚干燥器中开始干燥。

处于胶条和旋转模具中间的是如图 7、图 8 所示的楔子。在胶囊灌装过程中,楔子起了三个不同的作用。首先,它把胶条加热到接近凝胶-溶胶转变温度以保证在模具中挤压时两条冻胶条熔融;其次,楔子是把填充物从正排量泵分配到每个模具凹陷内的系统设备的一部分;最后,楔子与润滑剂一起,形成隔离胶条的密封表面以去除空气,使

囊壳和填充物密封,避免空气进入产品中。



图 6 刚制成的软胶囊

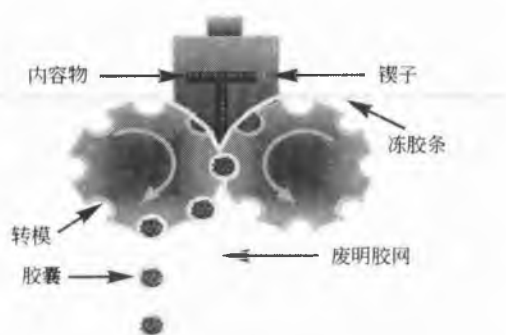


图7 软胶囊灌装工艺

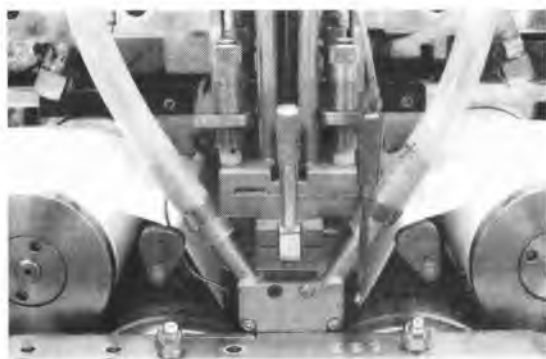


图8 模-锻设备的特写

为了制备合适的冻胶及胶条，冻胶配方应包含过量的水。灌装胶囊以后，软胶囊应经过干燥才能获得能承受后续工序、包装、运输，且具有长期物理稳定性的最终产品。干燥需要经过两步。初始干燥在一个转篮干燥器中进行，软胶囊在温度和湿度受控制的空气中翻滚，以去除大约一半的过多水分。在第二步的干燥中，软胶囊单层铺在浅盘中，过剩的水被除去。浅盘的设计和叠加可以让空气通过架子充满软胶囊的周围（图9）。第二步干燥在受控制的温度和湿度条件下进行，直至达到适宜的硬度或填充物的水分。完全的干燥需要3天到3周的时间，这取决于囊壳和填充物的处方及软胶囊的大小。



图9 在受控制的隧道烘箱中的干燥盘

一旦软胶囊达到期望的干燥终点，即置于容器中以避免进一步干燥。这时，可以进行更多的操作步骤如洗涤、印刷、检查和包装。

治疗作用

软胶囊剂型可以使药物的药动学行为得到增强，其精确处方取决于所期望的药动学改进。对这一剂型最常见的两个要求是吸收更快、更完全。在这两种情况下，理想的状态是药物按剂量溶于溶液中，分布到胃肠道介质后仍以溶液形式存在，也可能成为纳米乳。软胶囊包裹纳米乳预浓缩液的制备要求药物混合于由油、表面活性剂、辅表面活性剂和可能的混合溶剂组成的混合溶液中。

1. 吸收速率

以解决体内特定问题为目的的软胶囊剂型开发最近取得显著进步，包括药物以溶液形式暴露在胃肠道中，其吸收大大快于固体口服剂型的吸收。后者由于药物崩解后需要经过一个溶出过程，而使吸收速度受到限制。采用软胶囊中装溶液的方法，在有助于提高吸收速度的亲水性或高分散性介质中，囊壳于数分钟内破裂释放出药物溶液。这对于治疗如偏头痛或剧痛，或对在胃肠道内有吸收窗限制的药物是个有价值的贡献。图10比较了一种内充溶液的布洛芬软胶囊和一种布洛芬片剂的吸收速率^[8]。这组数据来自12名志愿者服用400mg的布洛芬的药动学比较结果。

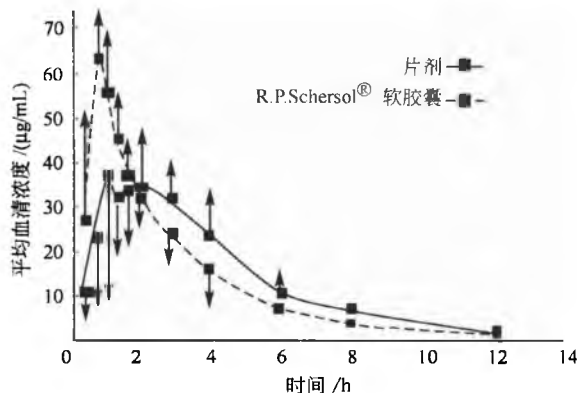


图10 布洛芬从软胶囊和片剂中的吸收速率比较

2. 增加生物利用度

除了增大吸收速率，软胶囊也能改善吸收的程度，这对于强疏水性药物来说，效果尤其明显。近来，蛋白酶抑制剂沙奎那韦新上市了具有专利的内充溶液的软胶囊剂型，其生物利用度提到到原来硬胶囊剂的3倍左右^[9]。

有时候，药物溶于与胃肠道液体接触后能自发形成微乳或纳米乳的介质中。这种特殊的介质由油和表面活性剂以合适的比例组成，一旦与水性液体接触，能形成平均乳滴小于100nm的乳液。药物的溶解能维持尽量长的时间，这样，溶解的药物便直接释放到消化道细胞膜。甚至可以利用人体的自身系统消

化油脂,以形成含溶解药物的胶束。图 11 表明与服用含微粉化药物混悬液的胶囊相比,含疏水性药物的纳米乳软胶囊给药后,12 名志愿者体内血浆药物浓度增高^[9]。

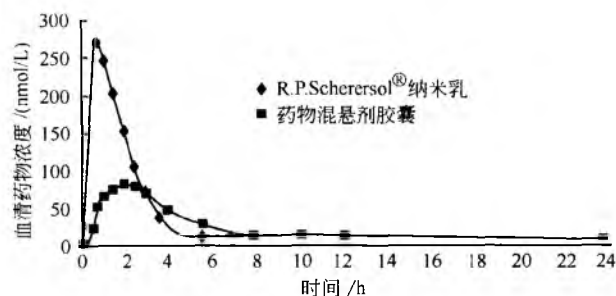


图 11 纳米乳软胶囊与药物混悬剂胶囊的药时曲线比较

3. 减小血浆浓度变化

药物血浆水平的变化大是生物利用度低的药物的一种常见特征。把药物制成溶液剂,能使药物的血浆水平变化减小。环孢菌素就从这种方法中获益^[10]。图 12 表示一种 10mg/kg 剂量的环孢菌素 A (Sandimmune®) 的溶液软胶囊制剂在 8 名志愿者体内的药时曲线^[11]。图 13 表示了另一种 10mg/kg 剂量的环孢菌素 A (Neoral®) 的微乳预浓缩软胶囊制剂在 8 名禁食的志愿者体内的药时曲线^[11]。

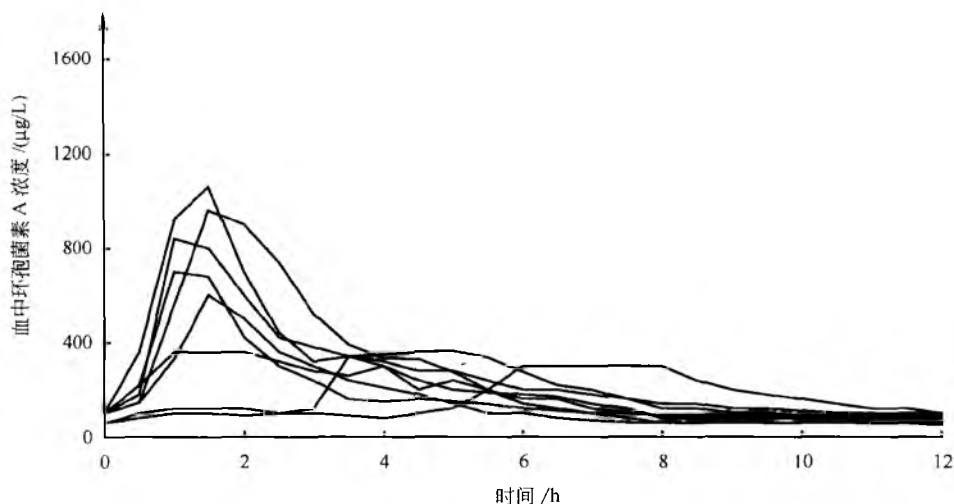


图 12 环孢菌素 A (Sandimmune®) 软胶囊处方

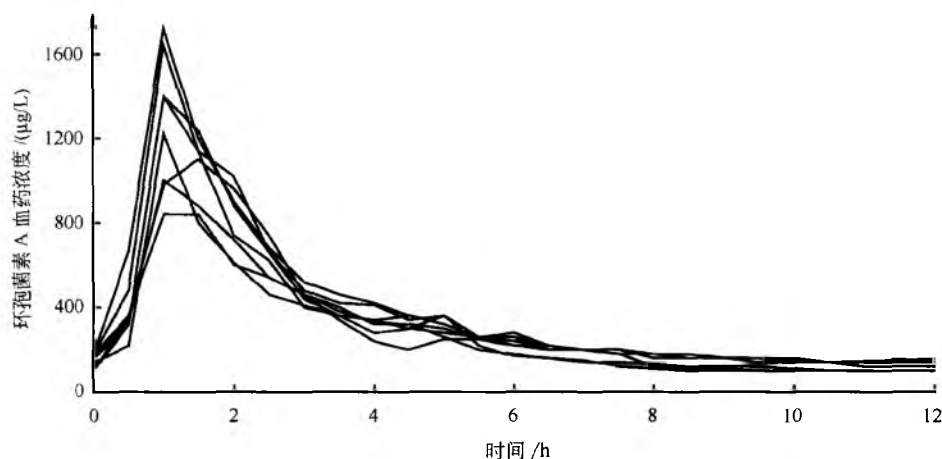


图 13 环孢菌素 A (Neoral®) 微乳浓缩物软胶囊处方



产品质量评价

1. 成分标准

人们采用了许多标准和控制手段以保证最终产品的质量,其中第一条就是保证辅料和活性成分的质量合格。辅料的检测应依照法定标准及在开发填充物和(或)囊壳时拟定的规范。其中包括痕量杂质限度,尤其是过氧化物、醛、某些金属和离子盐。这些杂质的存在会引起明胶的交联和可能的溶出问题,或经过一段时间会引起产品外观的非预期变化。

既然明胶是囊壳的关键成分,也是用量最大的一种辅料,明胶不仅要符合现行的 USP 标准,也要符合粒径、黏度和初轧强度这些对生产过程和最终产品稳定性很重要的其他控制指标。其他标准如某些离子型材料的用量,对于保证产品在储存过程中外观的稳定很重要。而且,指定或限定其他明胶的特性如颜色、甚至明胶来源(牛、猪、骨、皮革)很关键,这取决于处方和最终产品的销售市场。

2. 生产过程检测

在软胶囊生产过程中灌装胶囊这一步骤全程检测是常规的,包括确定填充物和囊壳的质量以及测定软胶囊密封衔接处的厚度。

填充物水分和(或)硬度的测定在干燥工序中进行,其测定结果用于决定每批产品的干燥终点。填充物质量、壳重、衔接处厚度和干燥终点这些规定是基于软胶囊的大小、填充物的量和种类以及前期工艺开发研究的结果。

3. 成品检测

一旦软胶囊的生产完成了所有要求的工序步骤,就要抽样用于成品放行检测。最终产品放行所需的检测取决于对产品的法定要求,常常包括微生物检测、活性成分含量测定和鉴别、物理外观、装样量、溶出或崩解以及含量均匀度。

新技术的近期进展

软胶囊处方和生产开发最新的发展取得了令人振奋的进步,包括灌胶囊前湿明胶条上产品商标的印制、在实验室条件下灌装少量的软胶囊用于早期稳定性测试或体内的快速评估以及将微球(控释或速释)混悬于填充物中后灌胶囊。

专利活动的趋势

一篇追溯近 10 年来美国专利活动的综述展现了在软胶囊技术领域存在一些有趣的趋势。虽然这篇综述仅仅局限于美国专利,但它很可能代表了世界范围的专利活动。更重要专利的列表见参考文献,按处方^[12~21]、生产技术^[22~29]或软胶囊设计创新^[30~40]分成几组。

术^[22~29]或软胶囊设计创新^[30~40]分成几组。

20 世纪 90 年代,有 210 项公开的专利援引明胶软胶囊作为特别权利要求或可能剂型的例子。在过去的 12 个月,大约公开了 760 项专利。明胶软胶囊技术的制药应用在过去的 10 年内得到增加。涉及软胶囊的专利数增加到原来的 4 倍,这一现象表明,这项技术的优势不论在临床应用上还是在患者和消费者欢迎度上都得到更广泛的理解。

更仔细地关注同期的专利,我们发现 1990 年有 45 项美国专利公开,在这些专利中明胶软胶囊是作为特别权利要求。过去一年中出现的大约 300 项专利也以明胶软胶囊作为特别权利要求。这项分析更好地表明了软胶囊技术相关的专利活动。含软胶囊处方的专利数增加到原来的 6 倍这一现象表明有关软胶囊制备的专门技术更多、更广泛了。它也表明以前所认为的难于制成制剂的药物[即低水溶性和(或)胃肠吸收不好或变化很大的药物]走出基础研究中心的比例越来越高。

对排名前 20 名制药公司或它们的前任公司 2000 年与 1990 年相比专利活动的检查发现,工业生产部门在明胶软胶囊的使用上发生了转变。1990 年,前 20 名的制药公司获得了 85% 的专利。近半年来,它下降到 57%。既然软胶囊技术在制药行业的整体应用增加了,那么合理的推论是相对年轻的、小的生物医药工业部门正在成熟,它们开始从基础研究向开发和商业化转化。

在 1990~2000 年,95% 的药用软胶囊产品所授权的专利与药物或填充物的配方有关,关于囊壳配方或生产工艺的权利要求不多。表面上,这表明了技术的成熟,但既然专利属于公共领域且工艺专利很难加强申报,企业领导者们更可能拒绝购买专利,除了某些特殊情况。在这个工艺关键的行业,期望公司出于竞争更愿意维持技术进步作为仅内部可知的秘密,这样会更合理些。

结论

尽管软胶囊有专门的生产工艺,它提供了一种多功能而且有效的药物输送系统,它与传统剂型相比有着独有的优势(如生物利用度增加、开发时间缩短、更受患者欢迎和剂量均匀性更好)。软胶囊的内在本质决定了它有广泛的用途和充分的填充物选择。在任何软胶囊的产品开发中,填充物和明胶囊壳的配方都应同时考虑,以便优化产品的质量和性能。

参考文献

1. Stanley, J. P. Soft Gelatin Capsules. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy, 2nd Ed.; Lachman, L., Lieberman, H. A., Kanig, J. L., Eds.; Lea Febiger: Philadelphia, 1976; 359.
2. Ferdinando, J. C. Formulation Solutions—Softgels. Pharmaceutical Manufacturing and Packaging 2000, March, 69—73.

R

3. Ward, A. G.; Courts, A. The Science and Technology of Gelatin; Academic Press: New York, 1977.
4. SPI Polyols, Inc. 321 Cherry Lane New Castle, DE 19720.
5. Rouquette America, Inc., Corporate Headquarters: 1417 Exchange Street, P. O. Box 6647 Keokuk, IA 52632-6647.
6. Jimerson, R. F. Softgel (Soft Gelatin Capsule) Update. Drug Development and Industrial Pharmacy 1986, 12 (8/9), 1133-1137.
7. Scherer, R. P. US Patent 1, 970, 396, 1934.
8. Saano, V.; Paronen, P.; Peura, P.; Vidgen, M. Relative Pharmacokinetics of Three Oral 400mg Ibuprofen Dosage Forms in Healthy Volunteers. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 1991, 29 (10), 381-385.
9. Perry, C. M.; Noble, S. Saquinavir Softgel Capsule Formulation. Drugs 1988, 55 (3), 461-486.
10. Kovarik, J. M.; Mueller, E. A.; Van Bree, J. B.; Tetzeloff, W.; Kutz, K. Reduced Inter- and Intraindividual Variability in Cyclosporine Pharmacokinetics from a Microemulsion Formulation. J. Pharm. Sci. 1994, 83 (3), 444-446.
11. Trull, A.; Tan, K. K. C.; Tan, L.; Alexander, G. J. M.; Jamieson, N. V. Absorption of Cyclosporin from Conventional and New Microemulsion Oral Formulations in Liver Transplant Recipients with External Biliary Diversion. Br. J. Clin. Pharmacol. 1995, 39, 627-631.
12. Benet, L. Z.; Wachter, V. J. Use of Essential Oils to Increase Bioavailability of Orally Administered Pharmaceutical Compounds. US Patent 6, 121, 234, Sept 19, 2000.
13. Lacy, J. E.; Embleton J. K.; Perry E. A. Delivery Systems for Hydrophobic Drugs. US Patent 6, 096, 338, Aug 1, 2000.
14. Wachter, V. J.; Benet, L. Z. Propyl Gallate to Increase Bioavailability of Orally Administered Pharmaceutical Compounds. US Patent 5, 962, 522, Oct 5, 1999.
15. Makino, H.; Hakamada, I.; Yamada, O. Solvent System to be Enclosed in Capsules. US Patent 5, 912, 011, June 15, 1999.
16. Rinaldi, M. A.; Saxena, S. J.; Tutschek, P. C. Softgel Formulation Containing Retinol. US Patent 5, 891, 470, April 6, 1999.
17. Adesunloye, A. T.; Stach, P. E. Filled Gelatin Capsules. US Patent 5, 874, 106, Feb 23, 1999.
18. Bayless, R. E.; Laba, D.; Reynolds, W. Polyoxyalkylene Glycol Gelatin Capsule Fill Formulations Comprising Crosslinked Carboxylic Copolymers. US Patent 5, 885, 671, March 23, 1999.
19. Punto, L.; Potini, C.; Gould, E. Topical Application Emulsions. US Patent 5, 587, 149, Dec 24, 1996.
20. Lambrechts, J. Shampoo Conditioner and Softgel Filled Therewith. US Patent 5, 573, 756, Nov 12, 1996.
21. Morton, F. S. S.; Shelley, R. S.; Patel, M. S. Enhanced Solubility Pharmaceutical Solutions. US Patent 5, 376, 688, Dec 27, 1994.
22. Yamamoto, T.; Yagyu, M. Appearance Inspecting Device for Solid Formulation. US Patent 6, 108, 030, Aug 22, 2000.
23. Schurig, G. A.; Bezaire, B.; Ratko, B.; Baker, L. A.; Mikalian, R. Method for Striping or Marbleizing Capsules. US Patent 6, 022, 499, Feb 8, 2000.
24. Schmidt, W. Method for the Purification and Recovery of Waste Gelatin Using Diafilters. US Patent 5, 945, 001, Aug 31, 1999.
25. Bierdel-Willkommen, E.; Sambale, C.; Hahnlein, W. Soft Gelatin Capsules. US Patent 5, 916, 591, June 29, 1999.
26. Julius, K.; Bagusche, C. Method and Apparatus for Sorting Capsules. US Patent 5, 819, 953, Oct 13, 1998.
27. Rowe, D. Method and Apparatus for Forming Soft Gelatin Capsules Containing Particulate Material. US Patent 5, 740, 660, April 21, 1998.
28. Stroud, N. S.; Walker, D. J.; Garnett, K. R.; Burnett, A. J.; Wood, A. J. Encapsulation Apparatus and Process. US Patent 5, 735, 105, April 7, 1998.
29. Steele, D.; Dietel, G. Softgel Manufacturing Process. US Patent 5, 200, 191, April 6, 1993.
30. Morton, F. S. S.; Duque, P. P.; Chiprich, T. B.; Stroud, N. S. Methods for Preparing Gelatin Capsules Containing Fragrances. US Patent 6, 099, 858, Aug 8, 2000.
31. Hoy, M. R. Multiphase Soft Gelatin Dosage Form. US Patent 6, 024, 980, Feb 15, 2000.
32. Brox, W.; Meinzer, A.; Zande, H. Soft Gelatin Capsule Manufacture. US Patent 5, 985, 321, Nov 16, 1999.
33. Cody, S. L.; Devlin, B. T.; Dubek, J.; Hoy, M. R. Fill Material for Soft Gelatin Pharmaceutical Dosage Form. US Patent 5, 919, 481, July 6, 1999.
34. Hutchinson, K. G.; Garnett, K. R.; Fischer, G.; Page, N. S. Soft Gelatin Capsule Shell Compositions. US Patent 5, 817, 323, Oct 6, 1998.
35. Stone, D. D. Graphically Impressed Softgel and Method for Making Same. US Patent 5, 827, 535, Oct 27, 1998.
36. Hutchison, K. G.; Garnett, K. R. Method of Preparing a Water-Based Beverage. US Patent 5, 681, 606, Oct 28, 1997.

37. Tanner, K.; Orange, K. Tamper Evident Pharmaceutical Dosage Form. US Patent 5, 624, 681, April 29, 1997.
38. Chiprich, T. B.; Hoylman, M. T.; Stroud, N. S. Capsule Shell Formulation to Produce Brittle Capsules. US Patent 5, 641, 217, March 25, 1997.
39. Stroud, N. S. High Amylose Starch Substituted Gelatin Capsules. US Patent 5, 554, 385, Sept 10, 1996.
40. Brox, W.; Block, P.; Schafer, R. Printed Shaped Bodies and Sheets Containing Gelatin. US Patent 5, 529, 767, June 25, 1996.

(王恬力 张 军 译)



S

色谱分析技术：薄层色谱法

Joseph Sherma

La Fayette College, Easton, Pennsylvania, U. S. A.

简介

薄层色谱 (thin layer chromatography, TLC) 是指将样品溶液以点或带的形式点于铺有薄层载体的板的原点。待样品溶剂挥干后, 将板置于盛有混合溶剂的密闭槽或缸内, 这种混合溶剂称为流动相。流动相通过毛细作用沿薄层向上延伸时, 样品开始展开。仪器展开方法, 如超压薄层色谱 (overpressured layer chromatography, OPLC) 或自动多重展开 (automated multiple development, AMP), 可提高分离度。将薄层板从槽内取出, 分离的区带通过物理或化学方法进行检测, 通过与同一板上标准区带的 R_f 值 (R_f = 样品区带迁移距离/溶剂前沿距离) 和颜色比较进行鉴别, 通过对区带大小和强度的目视或仪器光密度测定进行定量。区带鉴别可以通过用 TLC 与 UV、傅里叶转换红外、拉曼和质谱进行离线或在线联用来完成。TLC 的药物应用包括起始原料、中间体、原料药、制成品、体内药物及其代谢物的分析^[1]。

TLC 是一种灵活、通用、经济的分析方法, 各个操作步骤可以单独进行, 见图 1。与在线技术如 HPLC 比较, 离线方法可概括有如下优点^[2], 包括:

- 可以使用对混合组分具有专属选择性的各种固定相;
- 流动相溶剂的选择不受低 UV 透光率或需要超高纯度的限制;
- 由于所有样品组分都保存在板上, 所以为了优化定量, 不需要重复色谱过程, 就可以在不同条件下对光密度进行反复评估;
- 多样品检测效率高, 能够同时进行多个样品的色谱分离^[3];
- 由于每个样品所需流动相的量小, 所以溶剂购买和处理费极低;
- 定量的准确度和精密度高, 由于样品和标准品是在同一薄层板上和相同条件下进行色谱分离和测定的;
- 分析灵敏度通常可达纳克 (ng) 级到皮克 (pg) 级水平。

比较研究结果可见, 在药物分析中, 高效薄层色谱 (HPTLC) 在分析成本和时间方面均优于 HPLC^[4]。参考书目中包括 TLC 和 HPTLC 的原理、理论、实践、仪器和应用等内容。此外, 参考文献中还包括了因为篇幅有限而未在本文中详细介绍的上述问题及其他主题和应用。

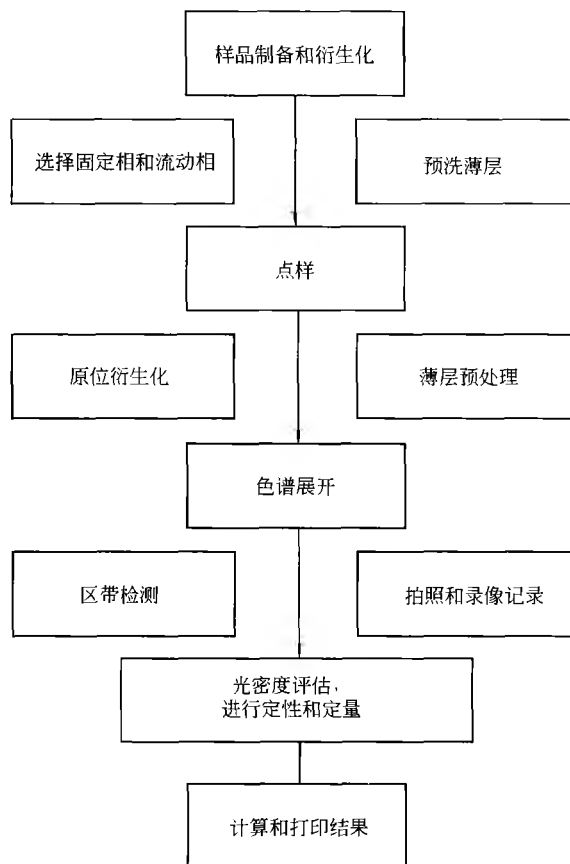


图 1 TLC 分析步骤的示意图 (经 Camag 公司许可)

实验过程

1. 样品制备

TLC 的样品提取和纯化程序与 GC 和 HPLC 相似。如果分析物的浓度足够高, 通常就可以简单地将药物制剂溶于溶剂中, 使分析物完全溶解, 辅料和其他外源性化合物则不能溶解, 这样得到的供试品溶液可直接点样进行 TLC 分析。为了确保分析物的溶解, 可能需要研磨样品, 采用加热和 (或) 超声等方法, 同时过滤或者离心去除不溶性辅料。如果分析物在复杂样品中的浓度很低, 为了使供试品溶液中分析物的浓度最大化, 同时使外来干扰组分的浓度最小化, 通常在 TLC 分析之前进行溶剂提取、纯化和浓缩等步骤。因为薄层板无法重复使用, 所以 TLC 分析的样品可以比用作 GC 或 HPLC 柱分析的样品较为粗糙, 包括

含有不可逆吸附杂质的样品。

传统方法,如液液分配、柱色谱、脱盐和去蛋白^[5]仍被广泛应用,但是更新的微波提取、固相萃取(SPE)^[6]和超临界流体萃取(SFE)等技术正日益应用于TLC分析前的样品分离和纯化。由无吸附活性的硅藻土或二氧化硅制成的含有预吸附或富集区域的特殊薄层板,可以保留某些干扰物质,使样品得到纯化^[7]。

样品的含量测定法,如片剂,通常要求取多个片子(如10~20片),研磨,混匀,称取相当于1片量的测试样品,而不是只分析1片样品,这样样品更能代表所取样的批号。

2. 固定相

商品的预制玻璃薄层板实际可用于所有分析。传统的TLC薄层板是20cm×20cm,薄层厚0.25mm,可展距10~12cm,而HPTLC薄层板更小(10cm×10cm或10cm×20cm),薄层厚更薄(0.1~0.2mm),吸附剂颗粒的平均粒径更小(5~6μm),可展距更短(3~7cm)。高效板能改善分离度,缩短分析时间,提高检测灵敏度,改善原位定量,可用于制药工业的光密度定量分析。TLC薄层板通常用于定性鉴别和纯度研究,药典中也有记载。

已报道的药物分析中超过90%采用正相吸附TLC,以硅胶为固定相,低极性溶剂为流动相,如氯仿-甲醇。反相TLC则采用以亲脂性的C18^[8]、C8、C2和苯基化学修饰的硅胶及饱和烷基硅胶为固定相的薄层板^[9],展开则以极性较强的水溶液为流动相,如甲醇-水或二氧六环-水^[10]。其他预制板还包括氧化铝^[11]、硅酸镁、氧化镁、聚酰胺^[12]、纤维素、硅藻土、离子交换树脂(如PEI纤维素阴离子交换树脂)以及含有键合氨基^[13]、氨基、二醇和硫醇基团的极性改良硅胶。极性键合相中的功能团取决于流动相的组成,通过一段疏水性间隔区(如正丙基)键合到硅胶上,能以多模式机制发挥作用。硅胶能够用各种试剂灌注以改善分离度(如EDTA用于四环素分析^[14])。

光学异构体分离可以使用由预先经二价铜盐和光学活性的羟脯氨酸纯对映体衍生物饱和的C18改良硅胶制成的手性板^[15],或者使用经手性选择剂如番木鳖碱饱和的硅胶板^[16],或者使用α激动剂的分子印记聚合物板^[17],或者在纤维素板上采用添加手性选择剂如环糊精的流动相^[18],这些报道大多数用于氨基酸及其衍生物分离。混合吸附剂可用于制备具有特殊选择性的薄层板。

点样前,特别是定量用TLC,薄层板通常用流动相或二氯甲烷-甲醇(1:1)预展开,或者浸入甲醇中进行清洁^[19]。

3. 流动相

特定分离的流动相通常以个人经验和类似文献为指导进行选择。此外,各种计算机辅助的流动相优化程序^[20]已经得到开发,用于流动相组分及其相对浓度的选择,最有名的是PRISMA模型。

根据不同的选择性常用的流动相系统如下:如正相TLC用二乙醚、二氯甲烷、氯仿中的个别混合液或以正己烷为强度调节剂;反相TLC用甲醇、乙腈和四氢呋喃,以水为强度调节剂。C18薄层上的离子对分离采用含有25mmol/L戊烷磺酸钠的甲醇-0.1mol/L乙酸盐缓冲液(pH=3.5)(15.5:4.5)为流动相^[21]。制药及药物分析中专用的流动相列于“TLC在制药及药物分析中的应用”部分。

4. 点样

样品溶液的点样方法取决于进行的是HPTLC、TLC还是制备薄层色谱(PLC),以及是定性分析还是定量分析。TLC的点样体积为0.5~5μL,HPTLC的点样体积为0.1~1μL,用体积固定的玻璃微量吸液管,如Drummond Microcaps或者体积可调选的10μL或25μL的数字微量移液器,将溶液手动点在薄层板原点处。此外,许多手动或自动仪器也可用于点样,特别用于定量HPTLC。

半自动的Linomat IV(图2)使用玻璃进样器喷射点进行点样,HPTLC板上的点样体积为2~99μL(制备板上为5~490μL),谱带的长度可以控制(1~190mm)。这种仪器更多是用于药物分析中的光密度定量。当1~25μL的样品用数字微量移液器手动点在含有预吸收区域的板上时,也能得到紧凑的谱带。带状点样的优点是可以获得最高的分离度,光密度扫描的定量精确度也最高。

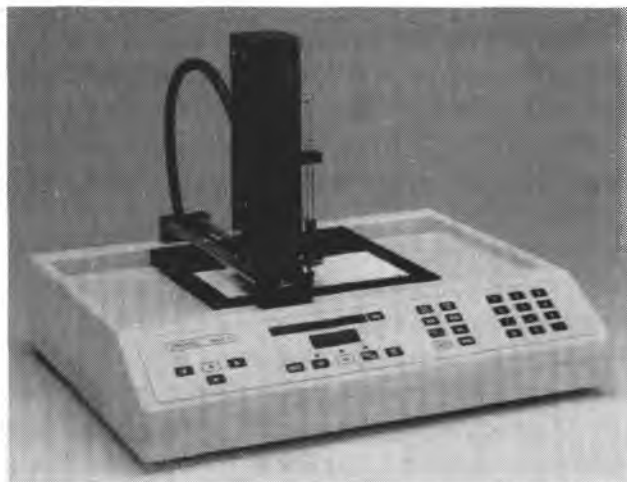


图2 Camag Linomat IV 带状点样机
(图片经 Camag 公司许可)

全自动的由计算机控制的点样器(如Camag Automatic TLC Sampler III),它是由不锈钢毛细管连接到步进电机控制的定量注射器所组成,能够从样品架上小瓶中依次取样,再以点或带的形式点样,点样体积10nL~50μL,可以恒定,也可以变化。

5. 色谱展开

除了固定相和流动相之外,TLC的分离效果还受气相

S

影响,这取决于展开过程中层析缸的类型、尺寸和饱和程度等。为了获得具有重现性的 TLC 分离,必须控制这三相之间的相互作用以及其他因素,如温度和相对湿度。恒溶剂流动相的展开过程是复杂的,这是由于薄层板和流动相之间的逐步平衡,以及薄层板与流动相中各组分相互作用的差异所造成的流动相中溶剂组分的分离等原因,后者导致形成了不明确但可重现的流动相梯度。

制药及药物分析中重要的展开方法包括经典的线性上行法展开、水平展开^[22]、采用 AMD 和 OPLC 的梯度 TLC 展开以及二维展开。这些展开方法都将做简单介绍。其他展开方法,如循环展开、反循环展开、连续展开和旋转展开都不将叙述。

在经典的线性上行展开法的 TLC 和 HPTLC 中,流动相置于大容量的具盖玻璃缸内(N缸)。点样板沿缸内壁一侧倾斜放置,低于起始线的下边缘浸于展开溶剂中。由于毛细流作用,溶剂开始快速上升,通过初始区带。缸内空间是否达到蒸气平衡(饱和),这取决于是否存在纸衬以及浸入板之前缸的静置时间。在流动相相同的情况下,与已饱和的缸相比,不饱和的缸能够得到不同的、通常更高的分离度。双槽缸(Camag)^[23]是一种改良的N缸,底部有倒V形的脊,将缸分成两部分。这种分割形成的一个槽允许小体积流动相的展开,而另一个槽则便于用流动相或其他调节液体(如硫酸水溶液控制湿度)或挥发性试剂使板达到预平衡。计算机控制的自动展开缸(Camag,图3)提供了可编程的、可重现的线性上行展开,无须操作者控制。

使用水平展开缸(Camag)允许多达70个样品在20cm×10cm的HPTLC板上从两端向中心同时展开,或者35个样品从一端向另一端同时展开。狭槽内的展开溶剂通过槽壁与玻璃片之间形成的毛细狭缝进入薄层板中。在预平衡和展开过程中缸用玻璃板盖上,同时控制蒸气的饱和度和相对湿度。

在一维多重展开中,薄层板在相同的溶剂体系或两种不同的溶剂体系中重复展开相同的距离^[24],这种手动方法可以改善区带迁移低于薄层板长度一半时的分离度^[13]。使用AMD仪器,可以改善多重展开^[25],其中一种见图3。AMD通常可进行1~25个单独的HPTLC板线性上行展开,采用的流动相梯度强度逐渐降低(也就是指硅胶极性逐渐降低),展开距离每个过程增加3~5mm。每一次展开前薄层板须经真空干燥,并用下一过程新鲜溶剂的蒸气相进行平衡。在AMD过程中,溶剂前沿经色谱区带的重复移动使其压缩成窄谱带(宽度约1mm),以至于每个80mm展开过程中点容量(在适用的薄层板距离内可被完全分离的区带数量)大于50。常用的“通用梯度”由溶剂甲醇或乙腈(极性),二氯甲烷、二异丙醚或叔丁基甲基醚(中等极性)和正己烷(非极性)组成。含有极性差异很大化合物的混合物可以用AMD在同一色谱中进行分离,每个组分的迁移距离与样品基质无关。AMD是最有前景的适用于现代TLC的展开方法,在药物分析中的应用将越来越多。



图3 全自动多重展开仪 (AMD2)
(图片经 Camag 公司许可)

在OPLC中,薄层板夹于刚性载体块和柔性塑料膜之间,流动相在10atm或25atm(Chrompres 10和25)的外压作用下泵入薄层中。流动相以恒定的线性流速(1~12mL/min)流经薄层,这样获得的分离效率比流速可变的毛细流更高。为了实现线性色谱,薄层板必须特殊制备,包括舍弃边缘,用高聚物密封剂处理以消除展开过程中的渗漏,以及在合适位置处切断流动相入口管道和溶剂出口管道。更新式的OPLC仪器(BS50)适用于线性恒溶剂展开或三步梯度展开,在线或离线模式,分析分离或制备分离;对预封的20cm×20cm或10cm×20cm硅胶板或C-18TLC板以及HPTLC板使用方便。在所有的TLC展开方法中,OPLC最接近HPLC。应用实例有HPTLC-OPLC^[26]测定德伦环烷(deramciciane)以及法医和临床药物筛选^[27]。除了常用的洗脱型展开之外,用于药物光密度分析的外力流动置换型(forced flow displacement)TLC已经报道^[28]。

在二维TLC中,样品混合物点于TLC板的一个角上,用第一种流动相展开,干燥,在垂直方向可用不同选择性的第二种流动相展开。据报道,二维TLC大大提高了点容量,毛细流展开为250~400,外力流动展开为500~2000。采用二维TLC测定安非他明衍生物^[13]和甲状腺类药物^[29]已有报道。

6. 区带观察(检测)

通过加热将流动相从展开板中去除后,薄层上的区带可以由区带自身的颜色、荧光、荧光猝灭等来检测,也可以加入某种试剂反应后显色、使具有紫外吸收或荧光区带

(色谱后衍生化)来检测。具有荧光或荧光猝灭的区带可在装有短波长(254nm)和长波长(366nm)紫外灯的小柜内观察。

荧光猝灭发生在含有荧光指示剂或磷的“F层”中。在254nm波长处具有紫外吸收的化合物,特别是那些具有芳香环和共轭双键的化合物,在绿色或淡蓝色背景上显示为深紫色斑点,这是因为吸附的化合物减弱(猝灭)了薄层板中均匀分布的荧光。许多药物可以导致荧光猝灭,这种方法广泛用于扫描检测和定量^[30]。

可以将通用的或选择性的生色(染色)和生荧光检测试剂喷在薄层板上,或将薄层板浸于上述试剂中,或将薄层板置于试剂蒸气中(如碘),或将试剂添加在流动相中或薄层板上,或者将吸有试剂的吸附性聚合物垫压制在薄层板上(超压衍生化)。能够与多种化合物反应的通用试剂有香草醛-硫酸^[31],茴香醛^[32]和碘,而茚三酮则是检测氨基酸的选择性试剂^[33],Dragendorff试剂广泛用于生物碱的检测^[34]。尽管喷雾法应用得最广泛,但是浸渍法的重现性更好,特别是采用机械化色谱浸泡仪器(Camag)时。在施加检测试剂后,为了加快检测反应,常须将板置于烘箱中或加热板上加热。生物生理检测方法,如生物自显影法,也可用于药用化合物^[35]。

由于可以选择多种方法进行区带检测和鉴别,TLC离线模式的重要优点是具有灵活性。例如,薄层板可以在长波和短波紫外光下观察,然后采用一种或多种生色、生荧光或者生物检测方法。

各种文献资料中记载了数以百计的试剂和检测方法^[36~38]。

7. 色谱记录

TLC分离可以通过拍照或摄像来记录^[39]。商品化的记录系统整合了标准即时照相机和CCD(charge coupled device)摄像机,适用于那些具有显色、荧光和荧光猝灭等区带的色谱图。复制TLC板的最新方法是使用计算机成像,已有可整合计算机、扫描仪、黑白或彩色打印机的系统^[40]。数码照相机(如Casio QV200)广泛用于TLC板的拍照,但是由于其具有使用软件操控文档的可能,因此在质控方面的应用还有疑问。

8. 定量分析

薄层色谱可以间接进行定量,刮取薄层板中样品和标准品的分离区带,将被测物用合适的溶剂从薄层材料中洗脱出来。校准洗脱液的体积,这些溶液用分光光度法、GC或者HPLC进行分析。通常是手动进行刮取和洗脱。尽管直接定量越来越重要,但是间接分析仍广泛应用(如美国药典中某些药物的含量测定)。

直接定量是指在原位分析,而不是洗脱斑点后分析。最简单的、直接的方法是对同一板上样品和标准品的区带大小和(或)强度(颜色)进行目测比较^[11]。这种定性/半定量方法已经被各类药典用来进行活性原料和制剂的纯

度分析。这些药典方法用于几种情况:①显示额外斑点作为简单的杂质检测;②通过与标准品 R_f 值的比较进行杂质的检测和鉴别^[41];③通过比较样品和同一化合物的标准品各自稀释液之间的光密度以检测、鉴别和估算杂质质量^[42]。

多数现代HPTLC定量分析都是原位进行的,使用一种以矩形狭缝形式存在的固定样品光束的色谱分光光度计(通常称为光密度计或扫描仪)测量样品和标准品的区带。用于线性反射(最常用)或透射扫描的单光束光密度计示意图见图4。钨灯或卤素灯用作有色区带(可见吸收)扫描的光源,而氙灯则用作紫外吸收区带直接扫描或F层上猝灭区带的光源。在所有可能的光密度模式中,多数定量药物分析是通过荧光猝灭区带的紫外吸收扫描进行的。单色器是棱镜,或者更通常是光栅,检测器则是光电倍增管或光电二极管。对于常用的荧光扫描,使用高强度的氙灯或汞灯作为光源,在薄层板和检测器之间放置截止过滤器,以阻止激发的紫外光,传输发出的可见荧光。Z形曲折、具有点光源的双波长反射扫描也可用于药物分析^[43]。

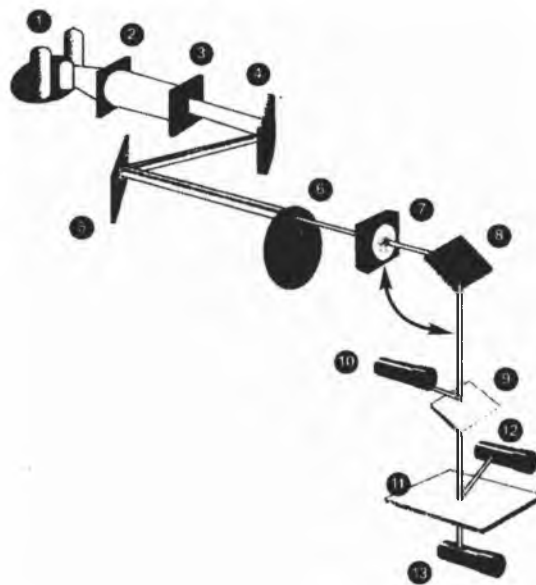


图4 TLC Scanner3的光路图(示意图承Camag公司许可)。①灯选择器;②入射透镜系统;③单色器入射狭缝;④单色器光栅;⑤反射镜;⑥狭缝孔;⑦透镜系统;⑧反射镜;⑨分光器;⑩参比光电倍增管;⑪扫描;⑫测量光电倍增管;⑬光电二极管

多数现代扫描仪都具有计算机控制的电机驱动单色器,可自动记录原位吸收和荧光激发光谱。通过将未知光谱与相同条件下获得的储存标准品光谱或同一板上测得的标准品光谱进行比较,有助于化合物的鉴别。从原位吸收光谱图中测得的光谱最大值通常是扫描样品和标准品区带进行定量分析的最佳波长。在现代仪器中,光密度计通常与计算机连接,并设计软件专门进行数据处理和自动扫描等操作。对于全自动系统,计算机能够执行以下操作:①采集数据;②为每个部分自动寻峰和优化扫描;③多波长扫描;

S

④基线定位和校正；⑤计算样品和同时展开的标准品的峰面积和(或)峰高，通过线性或多项式回归计算校正曲线^[44]，插值法计算样品浓度，统计分析重现性，以及提供完整的分析报告；⑥数据存盘。一般来说，外标法定量是通过一系列标准品生成的校正曲线进行的，这个系列标准品覆盖了整个分析浓度范围。尽管有时候也会使用内标法^[45]，但是因为样品和标准品是在相同条件下在同一板上展开的，这种方法是不会经常使用，除非在样品制备阶段中的损耗是预知的。

对于显色或荧光猝灭的区带，可以使用摄像光密度计影像处理来替代狭缝扫描光密度计^[8]。摄像扫描仪由可完全照亮薄层板的透射系统、CCD照相机、计算机和打印机以及色谱评估软件等组成。摄像光密度计不能直接测量紫外吸收区带或荧光区带；不能扫描具有可选波长的单一色光的薄层板；在开发的现阶段其准确度、精密度和灵敏度均不如狭缝扫描光密度计^[46]。与狭缝扫描光密度计相比，其优点之一是能进行二维色谱的定量^[47]。采用摄像技术的 TLC 已经成功用于植物药原料及其药品的指纹分析。

9. 特殊技术

9.1 流动相向 HPLC 的转变

TLC 的一个重要应用是作为 HPLC 的先导方法，而后者是药物分析中使用最广泛的方法。如果固定相类似，TLC 可以通过 HPLC 中 $\log k'$ 和 TLC 中 R_f 值的相关性，预测溶质的保留行为和特定流动相的适应性。其特殊应用是检测那些在流动相中迁移很少、以至在随后运行中会污染 HPLC 柱的化合物。

9.2 亲脂性测定

药物的亲脂性测定非常重要，因为分子的生物活性通常与其渗透通过各种疏水性屏障(膜)(也就是说，其亲脂性或疏水性)的能力相关。测定亲脂性最好的方法之一是通过反相 TLC 在浸渍石蜡油的硅胶板或者 C18 化学键合硅胶板上测量化合物的保留性质 [R_M 值， $R_M = (1 - R_f^{-1})$]。抗炎药物的研究就是一个应用实例^[48]。亲脂性和其他分子参数的 TLC 测定已有综述报道^[49]。

9.3 制备薄层色谱

分析 TLC 与 PLC 不同，后者要用更大量和更大体积的样品以带的形式跨越整个板宽，层厚为 0.5~2mm，有时甚至用更大的板，其目的是分离纯化 10~1000mg 的样品，供进一步分析。常用的是多重展开^[50]，被分离物用非破坏性方法检测(如紫外灯和碘蒸气)，从刮下的薄层材料中提取出被分离物。当分析型 TLC 不足以进行鉴别时，PLC 能够用来分离足够纯的药物化合物以进行光谱确证。PLC 的药理学应用实例包括新型倍半萜三聚物^[51]和苯丙碱配糖^[52]。

9.4 TLC-光谱联用方法

化合物鉴别最初是通过比较样品和标准品区带的 R_f 值

和由选择性检测试剂产生的颜色来进行的。鉴别可以通过 TLC 与离线或在线联用的光谱方法，如可见-紫外、荧光、FT-拉曼、FTIR^[53,54]、固态 NMR^[55]、MS^[56] 和 MS-MS 等得到确认。耦合 TLC-FTIR^[57] 和其他联用方法^[58] 已有综述报道。

HPTLC 光谱在线联用方法在临床化学中被推荐作为定量分析前鉴别的一种参照方法。这对于作为进一步临床治疗依据的精确诊断尤为重要^[59]。

9.5 薄层放射色谱法

放射性同位素标记物质在薄层板上的定位和定量需用放射自显影技术、闪烁计数区带分析^[60]，或者使用数字式放射自显影技术^[26]，或者使用生物影像分析仪^[61]。薄层放射色谱法广泛用于植物、动物和人体样品中杀虫剂和药物的代谢研究，以及放射药物的质量控制和开发^[62]。

10. 方法验证

验证程序是根据管理机构，如欧共体(EEC)的专利药物产品委员会(CPMP)的推荐，并考虑 TLC 操作的特殊性而制订的。通常考察以下验证参数：①选择性；②TLC 展开前、后和过程中的稳定性；③校正曲线的线性；④分析物的定量范围；⑤检测限、定量准确度和精确度；⑥准确度(表示系统误差)、精确度(表示随机误差)、灵敏度(测量浓度微小变化的能力)、耐用性(不同的分析者在不同场合的分析结果)。分析的每一步必须通过误差分析和适用性实验加以验证，包括样品制备、点样、TLC 分离、检测方法和定量。Szepesi 和 Nyiredy 阐述了药物 TLC 分析验证的定义、基本原理和实验方法^[42]。基准评测研究表明磷脂含量测定和纯度检查采用硅胶 HPTLC 板和硫酸铜-磷酸检测试剂，在 365nm 波长处扫描棕色-紫色区带的测定成本大大降低，与 HPLC 相比为 1:2.5^[63]。

11. TLC 在制药和药物分析中的应用

在制药和药物分析中，GC、HPLC 和 TLC 都具有各自的优缺点，互为补充。TLC 文献^[64]综述表明其在制药和药物中的应用比其他各类化合物更加普遍。

TLC 的应用包括以下各类样品的分析^[65]：

- 起始原料(植物提取物、动物来源提取物、发酵混合物)；
- 中间体(粗品、反应混合物、母液、副产品)；
- 药物原料(鉴别、纯度检查、含量测定、有关物质分离、稳定性试验^[10])；
- 制剂(鉴别、纯度检查、含量测定、储藏和破坏条件下的稳定性试验、含量均匀度检查^[66]、溶出度试验)；
- 生理介质中的药物及代谢物，如尿液、血浆或者胃液(药理学、毒理学^[67]、药物动力学^[68]、代谢学、生物等效性、法医学、依从性和药效学研究)。

TLC 分析广泛用于各类实验室，包括政府部门、药厂、医院、公安部门、竞技体育、赛马中违禁药物检测的合同

测试实验室和就业体检等。为了进行已知化合物和杂质的鉴别、纯度检查,以及获得原料药和制剂中杂质信息,同一板上展开的样品和对照品的 R_f 值和斑点尺寸和光密度,可以通过非仪器或仪器方法进行比较, TLC 系统能将化合物从不同类化合物或者非常接近的同类有关物质中分离出来。性质的确证通常需要使用在线或离线的辅助方法,如 IR、NMR 或 MS, GC 或 HPLC。

以下是药物分析中推荐使用的 8 种基本的标准 TLC 系统。

用于碱性药物: 硅胶板浸于 0.1mol/L 氢氧化钾溶液后干燥; 流动相: ① 甲醇-氨水 (100 : 1.5); ② 环己烷-甲苯-二乙胺 (75 : 15 : 10); ③ 氯仿-甲醇 (9 : 1); ④ 丙酮。

用于酸性和中性药物: 硅胶板; 流动相: ① 氯仿-甲醇 (4 : 1); ② 乙酸乙酯-甲醇-浓氨 (85 : 10 : 5); ③ 乙酸乙酯; ④ 氯仿-甲醇 (9 : 1)。

许多药物在这些系统中的迁移数据已经制成表格^[69]。其他 4 种标准硅胶系统中的 443 种药物的保留数据已经报道: ① 乙酸乙酯-甲醇-30% 氨溶液 (85 : 10 : 15); ② 环己烷-甲苯-二乙胺 (65 : 25 : 10); ③ 乙酸乙酯-氯仿 (1 : 1); ④ 丙酮。用丙酮展开前, 薄层板事先浸于氢氧化钾溶液中^[70]。以下筛选系统 (UniTox) 为正相和反相 TLC 提供了三种流动相。

用于酸性和中性药物: 甲醇-水 (65 : 35), C18 硅胶。

用于碱性、两性性和季铵化合物: ① 甲苯-丙酮-乙醇-浓氨 (45 : 45 : 7 : 3), 硅胶; ② 甲醇-水-浓盐酸 (50 : 50 : 1), C18 硅胶^[71]。

USP24/NF19 的第 201 节^[72] 记载了一个基本的 TLC 鉴别试验, 采用含有荧光指示剂的非高效硅胶板, 流动相为氯仿-甲醇-水 (180 : 15 : 1), 在 254nm 紫外灯下检测, 进行制剂中主成分的鉴别确证, 供试品溶液根据各论制备。USP24/NF19 的第 621 节简要介绍了经典的上行和连续展开 TLC 法的装置和程序。

使用最广泛的人用药、兽药以及违禁药的 TLC 分析信息和数据已经报道^[69]。此外, 也有 TLC 在药物分析中定量应用的报道^[73, 74]。两年一次的 TLC 综述中有关在药物和制药分析中的应用文献^[64] 一般超过 75 篇。

以下简要介绍 TLC 分析在药物制剂和生物样品中的典型应用实例。

12. 采用可见区带比较分析生物液

动物尿液中的克仑特罗和沙丁胺醇残留^[75]

- 样品制备: 在 C18 柱中固相萃取, 用 0.1% 三乙胺甲醇溶液洗脱。

- TLC: 具有富集区的硅胶 60 板, 流动相为乙酸乙酯-甲醇-乙酸 (8 : 1 : 1)。

- 检测: 用氯气进行 N-氯化, 在 N-氯衍生物上喷以碘联甲苯胺溶液显蓝点斑点。

- 定性鉴别和半定量分析: 比较样品和标准品的 R_f 值和颜色亮度。

13. 采用荧光光密度计分析生物液

血浆和尿液中的氢化可的松^[76]

- 样品制备: 用二氯甲烷提取。

- TLC: 用 Linomat IV 将提取液和标准品在铝衬的硅胶 60 板上点成宽 3~6mm 的带, 流动相为氯仿-甲醇 (9 : 1)。

- 检测: 薄板浸入异烟肼试液中 20s, 然后浸入氯仿-液态石蜡 (9 : 1) 中增强和稳定荧光。

- 定量: 在激发波长 366nm 和发射波长 460nm 处扫描。

- 验证: 检测限为 1 ng, RSD 为 1.4%~6.3%, 与 TLC-放射免疫测定法比较, 结果给出的相关系数分别为 0.97 和 0.98。

猪组织中的磺胺二甲嘧啶^[77]

- 样品制备: 磺胺溴甲嘧啶作为内标物加到组织中, 用水提取, 离心, 洗涤, 浓缩, 用 C18 键合硅胶、酸性氧化铝和 AG MP-1 阴离子交换小柱进行一系列固相萃取。

- TLC: 用 Linomat IV 将样品和标准品在硅胶 60 板上点成宽 6mm 的带, 流动相为乙酸乙酯-甲苯 (1 : 1)。

- 检测: 薄板浸入荧光胺溶液中。

- 定量: 在 366nm 或 400nm 处对分析物和内标物区带进行荧光扫描 (图 5)。

- 验证: 检测限为 0.25×10^{-9} , 分析范围 ($0.54 \times 10^{-9} \sim 2.18 \times 10^{-9}$) 内的平均回收率为 95.6% (标准偏差 29.4%, $n=54$)。

14. 采用可见区带比较分析药物制剂

烯丙雌醇原料药和片剂的纯度检查^[78]

- 样品制备: 原料药溶于氯仿中; 片剂研成粉后在丙酮中超声。

- TLC: 将 2.5 μ L 和 5 μ L 的样品、烯丙雌醇和杂质标准溶液试样手动在 HPTLC 硅胶板上点成宽 8mm 的带, 用 OPLC 展开, 流动相为环己烷-乙酸正丁酯-氯仿 (90 : 12 : 2)。

- 检测: 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 120℃ 加热 2min。

- 含量测定: 在 366nm 紫外灯下目视比较样品和标准品区带。

15. 采用可见光密度计分析药物制剂

糖浆中用于治疗呼吸道疾病的 S-羧甲基半胱氨酸^[33]

- 样品制备: 糖浆用 96% 乙醇-氨水 (4 : 1) 稀释。

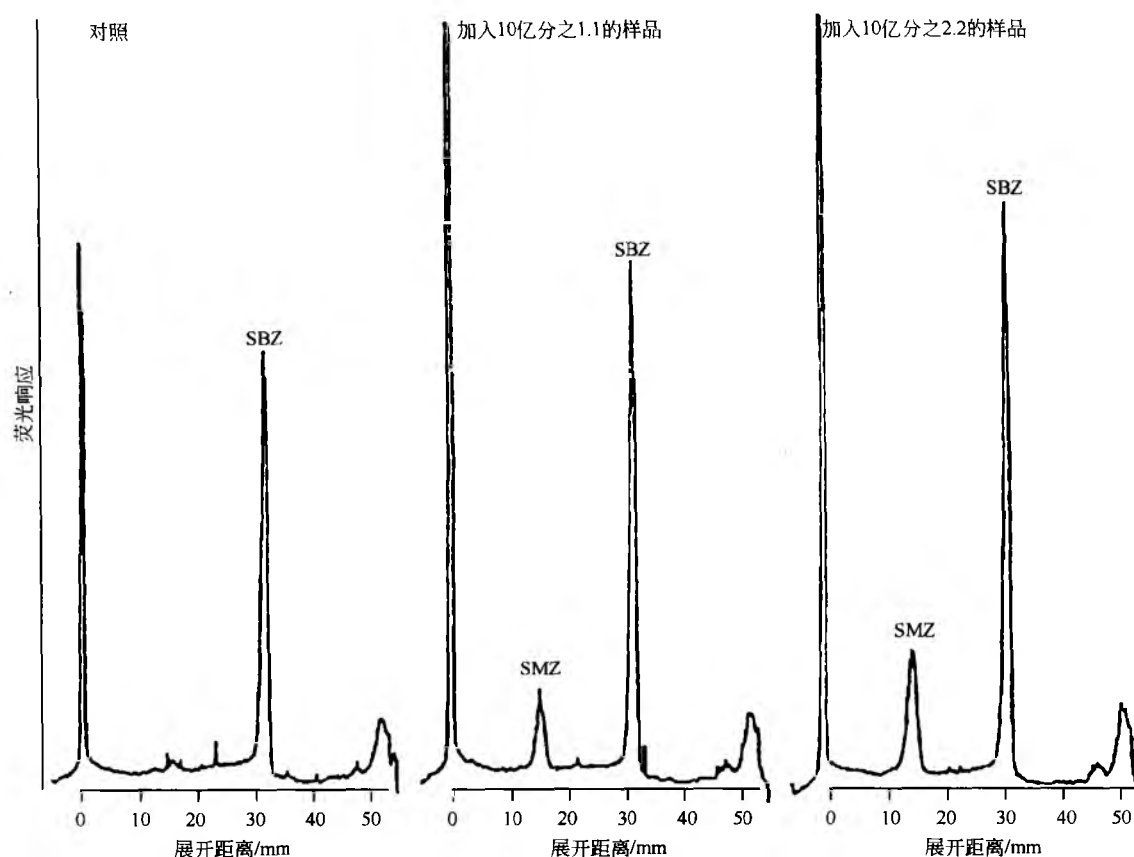


图5 样品光密度图^[77]。含有10ppb磺胺溴甲噻唑(SBZ)和0、1.1或2.2ppb磺胺二甲噻唑(SMZ)的猪肉组织样品。原点为0mm,溶剂前沿为53mm^[77]

- TLC: 用 Nanomat III 将样品和标准品点在硅胶 60 板上, 流动相为正丁醇-冰醋酸-水 (3:1:1), 双槽缸内展开。

- 检测: 薄板浸入茚三酮试液中, 在 100℃ 加热 3~4min。

- 定量: 487nm 波长处扫描区带。

- 验证: 检测限为 15ng/点, RSD 为 0.99%~1.6%, 成人糖浆和小儿糖浆的回收率分别为 100.0% 和 99.5%。

16. 采用紫外光密度计分析药物制剂

制剂中的硫酸沙丁胺醇和盐酸溴己新^[23]

- 样品制备: 样品溶液用甲醇制备, 浓度为 200~800ng/μL。

- TLC: 用 Linomat IV 将标准品和样品点在预涂氧化铝衬的硅胶 60F 板上, 流动相为甲醇-氯仿-三乙胺 (5.5:4.5:0.05), 在双槽缸内展开。

- 定量: 在 276nm 处扫描样品和标准品的荧光猝灭区带。

- 验证: 校正曲线的线性范围为 20~580ng/μL; 糖浆和片剂含量测定的 RSD 范围为 1.1%~1.6%, 回收率为 98.8%~99.6%。

片剂、软胶囊和硬胶囊抗组胺制剂中的盐酸苯海拉明^[79]

- 样品制备: 将研磨的细粉或胶囊内容物溶于乙醇中。

- TLC: HPTLC 硅胶 60F 板, 用 Linomat IV 将样品和标准品点成宽 6mm 的带, 流动相为乙酸乙酯-甲醇-浓氨溶液 (85:10:15), 在双槽缸内展开。

- 定量: 在 260nm 处扫描荧光猝灭区带。

- 验证: 精密度 RSD 范围为 1.7%~1.9%, 加样样品的回收率偏差为 0.81% 和 0%。

乳膏剂中的戊酸倍他米松和硝酸咪康唑^[80]

- 样品制备: 乳膏用 96% 乙醇超声, 离心和过滤去除不溶物。

- TLC: 用 Nanomat III 将 4μL 样品和标准品试样点在硅胶 60F 板上, 在双槽缸内用氯仿-丙酮-冰醋酸 (34:4:3) 展开。

- 定量: 在 233nm 处扫描荧光猝灭区带。

- 验证: 实验室小试的乳膏剂回收率分别为 100.1% 和 100.5%, RSD 范围为 0.68%~1.67% (n=6)。

片剂中的盐酸吡多辛和琥珀酸多西拉敏^[81]

- 样品制备: 片子研成细粉, 在甲醇中超声, 滤过。
- TLC: 用 Linomat IV 将 5 μ L 样品和标准品试样在 HPTLC 硅胶 60F 板上点成宽 6mm 的带, 流动相为丙酮-氯仿-甲醇-25%氨溶液 (7:1.5:3:1.2)。
- 定量: 在 269nm 处扫描荧光猝灭区带。
- 验证: 线性范围为 0.5~2.0 μ g/点; RSD 分别为 0.73% 和 1.93%, 回收率分别为 99.3%~103% 和 97.7%~101%。

17. 采用荧光光密度计分析药物制剂

片剂中的苯磺酸氨氯地平^[82]

- 样品制备: 片子研成细粉, 用甲醇溶解, 过滤。
- TLC: 用 Linomat IV 将样品和标准品点在硅胶 60F 板上, 以氯仿-乙酸-甲苯-甲醇 (8:1:1:1) 为流动相在双槽缸内展开。
- 定量: 在 366nm 处扫描荧光区带。
- 验证: 最小检测限为 0.2ng; 添加三个不同浓度标准品的预分析片回收率为 100.1%。

18. 采用刮取和洗脱区带分析药物制剂

局部疮剂中的硫^[83]

- 样品制备: 液体和乳膏剂样品用丙酮或氯仿煮沸溶解。
- TLC: 将样品和标准品在硅胶 G 板上点成宽 2cm 的带, 流动相为石油醚。
- 检测: 碘蒸气。
- 定量: 刮取区带, 用氯仿洗脱, 在 265nm 处测定紫外吸收。
- 验证: 含有 3%~5% 硫的三种加样样品的平均回收率为 99.2% \pm 2%、100% \pm 2% 和 101% \pm 1% ($n=5$), 每份测定 5 次。

参 考 文 献

1. Arun, P.; Ravikumar, A.; Leelamma, S.; Kurup, K. A. Identification and Estimation of Endogenous Digoxin in Biological Fluids and Tissues by TLC and HPLC. *Indian J. Biochem. Biophys.* 1998, 35, 308-312.
2. Sherma, J. Comparison of Thin Layer Chromatography and Liquid Chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1991, 74, 435-437.
3. Dhanesar, S. C. Quantitation of Antibiotics by Densitometry on a Hydrocarbon-Impregnated Silica Gel HPTLC Plate. Part II. Quantitation and Evaluation of Ceftriaxone. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1998, 11, 258-262.
4. Morlock, G.; Charegaonkar, D. Determination of Hydrocortisone and Cinchocaine in Lanolin Ointments. *GIT Lab. J.* 1998, 2, 95-98.
5. Habel, D.; Guermouche, S.; Guermouche, M. H. HPTLC Determination of Isoniazid and Acetylisoniazid in Serum. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1997, 10, 453-456.
6. Popa, D.-S.; Oprean, R.; Curea, E.; Preda, N. TLC-UV Densitometric and GC-MSD Methods for Simultaneous Quantification of Morphine and Codeine in Poppy Capsules. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 18, 645-650.
7. Sherma, J.; Incarvito, C. D. Analysis of Tablets and Caplets Containing Ketoprofen by Normal- and Reversed-Phase HPTLC with Ultraviolet Absorption Densitometry on Preadsorbent Plates. *Acta Chromatogr.* 1997, 7, 124-128.
8. Simonovska, B.; Prosek, M.; Vovk, I.; Jelen-Zmitek, A. High Performance Thin Layer Chromatographic Separation of Rantidine Hydrochloride and Two Related Compounds. *J. Chromatogr. B* 1998, 715, 425-430.
9. Dhanesar, S. C. Quantitation of Antibiotics by Densitometry on a Hydrocarbon-Impregnated Silica Gel HPTLC Plate. Part IV: Quantitation and Evaluation Penicillins. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1999, 12, 180-185.
10. Lazaric, K.; Cucek, B.; Faust, G. RPTLC Method for Determining Parabens in Oral Antacid Suspension During Stability Testing. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1999, 12, 86-88.
11. Radembin, N.; Loiseau, P. M.; Dessalles, M.-C.; Marchat, L.; Bories, C.; Gayral, P.; Mahuzier, G. Epoxyethane/ethynesulfonamides with Antifilarial Activities. *Arzneim. Forsch/Drug Res.* 1998, 48, 294-299.
12. Zaidi, F.; Voiron, B.; Jay, M.; Viricel, M. R. Free Flavonoid Aglycones from Leaves of *Mentha Pulegium* and *M. Suaveolens* (Labiatae). *Phytochemistry* 1998, 48, 991-994.
13. Fater, Z.; Tasi, G.; Szabady, B.; Nyiredy, S. Identification of Amphetamine Derivatives by Uni-Dimensional Multiple Development and Two-Dimensional HPTLC Combined with Postchromatographic Derivatization. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1998, 11, 225-229.
14. Dong, C.; Xie, H.; Shuang, S.; Liu, C. Determination of Tetracycline and 4-Epimeric Tetracycline by TLC-Fluorescence Scanning Densitometry. *Anal. Lett.* 1999, 32, 1121-1130.
15. Darula, Z.; Torok, G.; Wettmann, G.; Mannekens, E.; Iterbeke, K.; Toth, G.; Tourwe, A. A Rapid, Qualitative Thin Layer Chromatographic Method for the Separation of the Enantiomers of Unusual Aromatic Amino Acids. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1998, 11, 346-349.
16. Bhushan, R.; Thuku, G. T. Direct Enantiomeric Reso-

- lution of some 2-Arylpropionic Acids Using (—) Brucine-Impregnated Thin Layer Chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 1999, 13, 276—278.
17. Suedee, R.; Saelim, J.; Thavornpibulbut, T.; Srichana, T. Chiral Determination of Various Adrenergic Drugs by Thin Layer Chromatography Using Molecularly Imprinted Chiral Stationary Phases Prepared with Alpha-Agonists. *Analyst* (Cambridge, UK) 1999, 124, 1003—1009.
18. Huynh, T. K. X.; Lederer, M. Adsorption Chromatography on Cellulose. XI. Chiral Separations with Aqueous Solutions of Cyclodextrins as Eluents. *J. Chromatogr.* 1994, 659, 191—197.
19. Maxwell, R. J.; Lightfield, A. R. An Improved Method for Efficient Predevelopment Washing of HPTLC Plates. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1999, 12, 109—113.
20. Muller, D.; Ebel, S. Two-Dimensional Thin Layer Chromatographic Separation of H₁-Antihistamines. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1997, 10, 420—426.
21. Xu, X.; Stewart, J. T. Quantitative Analysis of Propantheline Bromide and Related Compounds in Drug Substance and Tablet Dosage Form by HPTLC And Scanning Densitometry. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1998, 11, 222—224.
22. Misztal, G. Thin Layer Reversed Phase Ion Pair Chromatography of some Cephalosporins. *J. Liq. Chromatogr. & Relat. Technol.* 1999, 22, 1589—1598.
23. Argekar, A. P.; Powar, S. G. Simultaneous Determination of Salbutamol Sulfate and Bromhexine Hydrochloride in Formulations by Quantitative Thin Layer Chromatography. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1998, 11, 254—257.
24. Krishnamurthy, R.; Ashwini, K. Simultaneous Determination of Adulterants and Coextractants in Illicit Heroin by HPTLC with Two Successive Mobile Phases. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1997, 10, 388—390.
25. Szabady, B.; Fater, Z.; Nyiredy, S. Comparative Study of Automated Development Chambers. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1999, 12, 82—88.
26. Szunyog, J.; Mincsovics, E.; Hazai, I.; Klebovich, I. A New Tool in Planar Chromatography: Combination of OPLC and DAR for Fast Separation and Detection of Metabolites in Biological Samples. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1998, 11, 25—29.
27. Ojanpera, I.; Goebel, K.; Vuori, E. Toxicological Drug Screening by Overpressured Layer Chromatography. *J. Liq. Chromatogr. & Relat. Technol.* 1999, 22, 161—171.
28. Csermely, T.; Kalasz, H.; Rischak, K.; Bathori, M.; Tarjanyi, Z.; Gyarmati, Z.; Furst, S. Planar Chromatography of (—)-Deprenyl and some Structurally Related Compounds. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1998, 11, 247—253.
29. de Wasch, K.; de Brabander, H. F.; van Ginkel, L. A.; Spaan, A.; Sterk, S. S.; Meiring, H. D. Confirmation of Residues of Thyreostatic Drugs in Thyroid Glands by Multiple Mass Spectrometry After Thin Layer Chromatographic Screening. *J. Chromatogr. A* 1998, 819, 99—111.
30. Wang, P.; Zhou, M.; Feng, Y.; Chen, L. Simultaneous Determination of Trace Ofloxacin and Enoxacin by TLC-Fluorescence Spectrodensitometry. *Anal. Lett.* 1998, 31, 1523—1531.
31. Rischer, M.; Adamczyk, M.; Ratz, H.; Hose, H.; Marchsan, M.; Paper, D. H.; Franz, G.; Wolf-Heuss, E.; Engel, J. Quantitative Determination of the Iridoid Glycosides and Catapol in *Plantago Lanceolata* L. Extracts by HPTLC and HPLC. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1998, 11, 374—378.
32. Mangle, M. S.; Jolly, C. I. HPTLC Studies on *Tribulus Terrestris* L. (Chota Gokhru) and *Pedalum Murex* L. (Bada Gokhru). *Indian Drugs* 1998, 35, 189—194.
33. Idrayanto, G.; Widjaja, S.; Aditama, L.; Darmawan, L. Densitometric Determination of S-Carboxymethylcysteine in Syrup, and Validation of the Method. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1998, 11, 263—266.
34. Chia, J. -C.; Chang, F. -R.; Li, C. -M.; Wu, Y. -C. Protoberberine Alkaloids from *Fissistigma Balansae*. *Phytochemistry* 1998, 48, 367—369.
35. Hostettmann, K.; Terreaux, C.; Marston, A.; Potterat, O. The Role of Planar Chromatography in the Screening and Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1997, 10, 251—257.
36. Jork, H.; Funk, W.; Fischer, W.; Wimmer, H. Thin Layer Chromatography, Reagents and Detection Methods, Physical and Chemical Detection Methods; Fundamentals. Reagents I; VCH: Weinheim Germany, 1990; 1a.
37. Jork, H.; Funk, W.; Fischer, W.; Wimmer, H. Thin Layer Chromatography, Reagents and Detection Methods, Physical and Chemical Detection Methods; Activation Reactions, Reagent Series. Reagents II; VCH: Weinheim Germany, 1993; 1b.
38. Zweig, G.; Sherma, J. *Handbook of Chromatography*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1972; II, 103—189.
39. Hahn-Deinstrop, E.; Koch, A.; Mueller, M. Guidelines for the Assessment of the Traditional Herbal Medicine "Olibanum" by Application of HPTLC and Desaga ProViDoc Video Documentation. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1998, 11, 404—410.

40. Rozylo, J. K.; Siembida, R.; Jamrozek-Manko, A. A New Simple Method for Documentation of TLC Plates. *J. Planar Chromatogr. -Mod. TLC* 1997, 10, 225—228.
41. Kenyon, A. S.; Xiaoye, S.; Yan, W.; Ng, W. H.; Prestidge, R.; Sharp, K. Simple, At-Site Detection of Diethylene Glycol/Ethylene Glycol Contamination of Glycerin and Glycerin-Based Raw Materials by Thin Layer Chromatography. *J. AOAC Int.* 1998, 81, 44—50.
42. Szepesi, G.; Nyiredy, Sz. Pharmaceuticals and Drugs. *Handbook of Thin Layer Chromatography*, 2nd Ed.; Sherma, J., Fried, B., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1996, Ch. 24.
43. Fu, Q.; He, L.; Miao, Z. Analysis of Strychnine Alkaloids in Biological Samples by Thin Layer Chromatographic Densitometry and Distribution Study of Strychnine in Intoxicated Rats. *J. Xi'an Med.* 1998, 10, 146—149.
44. DiGregorio, D.; Sherma, J. Analysis of the Active Ingredient Magnesium Salicylate in Analgesic Tablets by HPTLC with Ultraviolet Absorption Densitometry. *J. Planar Chromatogr. -Mod. TLC* 1999, 12, 230—232.
45. Hijli, P. S.; Phadke, M. M.; Shah, M. C.; Deshpande, P. P.; Sane, R. T. A High Performance Thin Layer Chromatographic Method for Determination of Doxazosin from Pharmaceutical Preparation. *Indian Drugs* 1998, 35, 653—657.
46. Essig, S.; Kovar, K. -A. Impurity Test of Theophylline; Comparison of Classical Slit Scanner with Videodensitometry. *J. Planar Chromatogr. -Mod. TLC* 1999, 12, 63—65.
47. Petrovic, M.; Kastelan-Macan, M.; Babic, S. Quantitative Evaluation of 2D Chromatograms with a CCD Camera. *J. Planar Chromatogr. -Mod. TLC* 1998, 11, 353—356.
48. Forgacs, E.; Cserhati, T.; Kaliszan, R.; Haber, P.; Nasal, A. Reversed Phase Thin Layer Chromatographic Determination of the Hydrophobicity Parameters of Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *J. Planar Chromatogr. -Mod. TLC* 1998, 11, 383—387.
49. Cserhati, T.; Forgacs, E. Structure-Retention Relationships and Physicochemical Characterization of Solutes in Thin Layer Chromatography. *J. AOAC Int.* 1998, 81, 1105—1107.
50. Pradhan, P.; Banjerl, A. Stereochemistry of Diastereomeric Neolignans from Piper Hookeri by Nuclear Resonance Spectroscopy. *Phytochem. Anal.* 1998, 9, 71—74.
51. Kawabata, J.; Fukushi, E.; Mizutani, J. Sesquiterpene Dimer and Trimer from *Chloranthus Japonicus*. *Phytochemistry* 1998, 47, 231—235.
52. Kernan, M. R.; Amarquaye, A.; Chen, J. L.; Mrisho, S.; Rozhou, E. J. Antiviral Phenylpropanoid Glycosides from the Medicinal Plant *Markhamia Lutca*. *J. Natural Products* 1998, 61, 564—570.
53. Bauer, G. K.; Pfeifer, A. M.; Hauck, H. E.; Kovar, K. -A. Development of an Optimized Sorbent for Direct HPTLC-FTIR On-Line Coupling. *J. Planar Chromatogr. -Mod. TLC* 1998, 11, 84—89.
54. Stahlmann, S.; Kovar, K. -A. Analysis of Impurities by High Performance Thin Layer Chromatography with Fourier Transform Infrared Spectroscopy and UV Absorbance Detection In Situ Measurement: Chlordiazepoxide in Bulk Powder and its Tablets. *J. Chromatogr. A* 1998, 813, 145—152.
55. Wilson, I. D.; Spraul, M.; Humpfer, E. Thin Layer Chromatography Combined with High Resolution Solid State NMR for Compound Identification without Substance Elution: Preliminary Results. *J. Planar Chromatogr. -Mod. TLC* 1997, 10, 217—219.
56. Brzezinka, H.; Dallakian, P.; Budzikiewicz, H. Thin Layer Chromatography and Mass Spectrometry for Screening of Biological Samples for Drugs and Metabolites. *J. Planar Chromatogr. -Mod. TLC* 1999, 12, 96—108.
57. Stahlmann, S. A. Ten-Year Report on HPTLC-FTIR Online Coupling. *J. Planar Chromatogr. -Mod. TLC* 1999, 12, 5—12.
58. Cserhati, T.; Forgacs, E. Hyphenated Techniques in Thin Layer Chromatography. *J. AOAC Int.* 1998, 81, 329—332.
59. Wagner, J.; Jork, H.; Koglin, E. HPTLC as a Reference Method in Clinical Chemistry: On-Line Coupling with Spectroscopic Methods. *J. Planar Chromatogr. -Mod. TLC* 1993, 6, 446—451.
60. Klebovich, I.; Mincsovcis, E.; Szunyog, J.; Ludanyi, K.; Karancsi, T.; Ujszaszy, K.; Kiss, B. D.; Vekey, K. Isolation and Identification of Metabolites of ^3H - and ^{14}C -Deramciclane by OPLC-Digital Autoradiography On-Line Sample Collection and Mass Spectrometry. *J. Planar Chromatogr. -Mod. TLC* 1998, 11, 394—399.
61. Yamaguchi, T.; Nakajima, Y.; Mizobuchi, M.; Inazawa, K.; Kanazu, T.; Kadono, K.; Ohkawa, T.; Iwatani, K. Disposition and Metabolism of the New Hypocholesterolemic Compound S-8921 in Rats and Dogs. *Arzneim. -Forsch. /Drug Res.* 1998, 48, 995—1006.
62. Ishigai, M.; Ishitani, Y.; Oriksa, Y.; Kamiyama, H.; Kumaki, K. Metabolism of 2 (R, S)-1, 2-Bis (Nicotinamido)-Propane, a New Agent with Anti-Vasospasm Activity, in Rats and Rabbits. *Arzneim Forsch. /Drug*

S

- Res. 1998, 48, 429—435.
63. Renger, B. Benchmarking HPLC and HPTLC in Pharmaceutical Analysis. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1999, 12, 58—62.
64. Sherma, J. Planar Chromatography. *Anal. Chem.* 2000, 72, 9R-25R, Biennial Reviews of TLC have been Published each Even-Numbered Year in the Review Issue of *Anal. Chem.* since 1970.
65. Szepesi, G. Some Aspects of the Validation of Planar Chromatographic Methods in Pharmaceutical Analysis. I: General Principles and Practical Approaches. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1993, 6, 187—197.
66. Novakovic, J.; Nova, H.; Filka, K. In-Process Control and Process Parametric Assessment of Isosorbide 5-Mononitrate Pharmaceuticals. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1999, 12, 161—164.
67. Binter-Planas, V.; Durand, J. L.; Prognon, P.; Maison, C. Toxicological Research on Selective Serotonin Re-Uptake Inhibitors in Gastric Liquid by Thin Layer Chromatography. *J. Pharm. Clin.* 1997, 16, 266—269.
68. Mody, V. D.; Pandya, K.; Satia, M. C.; Modi, I. A.; Modi, R. I.; Gandhi, T. P. High Performance Thin Layer Chromatographic Method for the Determination of Sparfloxacin in Human Plasma and its Use in Pharmacokinetic Studies. *Biomed. Anal.* 1998, 16, 1289—1294.
69. Ng, L. L. Pharmaceuticals and Drugs. *Handbook of Thin Layer Chromatography*, 2nd Ed.; Sherma, J., Fried, B., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1991; 717—755.
70. Romano, G.; Caruso, G.; Musumarra, G.; Pavone, D.; Cruciani, G. Qualitative Organic Analysis. Part 3. Identification of Drugs and their Metabolites by Standardized TLC Data. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1994, 7, 233—241.
71. Ojanpera, I.; Ojansivu, R.-L.; Nokua, J.; Vuori, E. Comprehensive TLC Drug Screening in Forensic Toxicology: Comparison of Findings in Urine and Liver. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1999, 12, 38—45.
72. The United States Pharmacopeia 24/National Formulary 19; The United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, 2000.
73. Renger, B. Quantitative Planar Chromatography as a Tool in Pharmaceutical Analysis. *J. AOAC Int.* 1993, 76, 7—13.
74. Renger, B. Contemporary Thin Layer Chromatography in Pharmaceutical Analysis. *J. AOAC Int.* 1998, 81, 333—339.
75. Posyniak, A.; Niedzielska, J.; Semeniuk, S.; Zmudzki, J. Screening for Clenbuterol and Salbutamol Residues in Urine by Planar Chromatography. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1995, 8, 157—159.
76. Fenske, M. Determination of Cortisol in Plasma and Urine by Thin Layer Chromatography and Fluorescence Derivatization with Isonicotinic Acid and Hydrazine. *Chromatographia* 1998, 47, 695—700.
77. Unruh, J.; Schwartz, D. P.; Barford, R. A. Quantitation of Sulfamethazine in Pork Tissue by Thin Layer Chromatography. *J. AOAC Int.* 1993, 76, 335—341.
78. Wiszkienszky, A.; Maho, S.; Vegh, Z.; Ferenczi-Fodor, K. Validated, Stability-Indicating Semiquantitative Purity Test for Allylestrenol Drug Substance and Tablet by Personal OPLC. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1998, 11, 463—466.
79. Muller, E. E.; Sherma, J. Quantitative HPTLC Determination of Diphenhydramine Hydrochloride in Tablet, Gelcap, and Capsule Antihistamine Pharmaceuticals. *J. Liq. Chromatogr. & Relat. Technol.* 1999, 22, 153—159.
80. Indrayanto, G.; Widjaja, S.; Sutono, S. Simultaneous Densitometric Determination of Betamethasone Valerate and Miconazole Nitrate in Cream, and its Validation. *J. Liq. Chromatogr. & Relat. Technol.* 1999, 22, 143—152.
81. Argekar, A. P.; Sawant, J. G. Simultaneous Determination of Pyridoxine Hydrochloride and Doxylamine Succinate in Tablets by HPTLC. *J. Liq. Chromatogr. & Relat. Technol.* 1999, 22, 2051—2060.
82. Chandrashekhar, T. G.; Rao, P. S. N.; Smrita, K.; Vyas, S. K.; Dutt, C. Analysis of Amlodipine Besylate by HPTLC with Fluorimetric Detection: A Sensitive Method for Assay of Tablets. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 1994, 7, 458—460.
83. Sanyal, A. K.; Chowdhury, B.; Banerjee, A. B. Rapid Thin Layer Chromatographic Microestimation of Elemental Sulfur: Application to Complex Sulfur Ointments. *J. AOAC Int.* 1993, 76, 1152—1155.

进一步阅读

- Adomovics, J. A., Ed. *Analysis of Addictive and Misused Drugs*; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1995.
- Camag Planar Chromatography Catalog; Camag Scientific Inc.: Wilmington, NC, 1998/99.
- Cserhati, T.; Forgacs, E. *Thin Layer Chromatography. Chromatography Fundamentals, Applications, and Troubleshooting*; Walker, J. Q., Ed.; Ch. 3, Preston Publications; Niles, IL, 1996.
- Fried, B.; Sherma, J. *Thin Layer Chromatography-Techniques and Applications*, 4th Ed.; Marcel Dekker, Inc.:

- New York, 1999.
- Jaenchen, D. E. Thin Layer (Planar) Chromatography. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry; Settle, F., Ed.; Ch. 13, Prentice Hall, PTR; Upper Saddle River, NJ, 1997.
- Sherma, J. Modern High Performance Thin Layer Chromatography. J. AOAC Int. 1994, 77, 297—306.
- Sherma, J., Fried, B., Eds. Handbook of Thin Layer Chromatography, 2nd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1996.

(陈 阳 译)

S

S

色谱分析技术：高效液相色谱法

R. Raghavan

Jose C. Joseph

Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, U. S. A.

引言

色谱法是分离混合物中各个组分的一种技术。与其他定量分析方法相比，高效液相色谱法（high-performance liquid chromatographic, HPLC）通常更受欢迎。本法通常对被测物具有专属性，因此各个组分都可以轻易达到良好地分离。HPLC 仪的使用相当普遍，如用于生物技术、生物医学、临床和药物分析等。此外，它还用于多个其他领域，包括化学、化妆品、能源、环境和食品工业。由于仪器价格适中、可靠、有效、成熟，使用范围可从合成或者可能成为药物的分离到药物制剂的质量控制，所以 HPLC 成为药物分析的优选方法。

自从 20 世纪 60 年代建立了 HPLC 基本理论以来，HPLC 仪的发展非常显著。到 70 年代，柱填材的开发推动了反相色谱法的发展。80 年代，计算机和自动化的进步使 HPLC 的使用更加方便。到 90 年代，微型柱、专用柱、稳定检测器配合积分数据采集、储存、检索能力的发展，大大提高了 HPLC 仪分析的速度和效率。

基本概念、定义和色谱理论

基本概念和定义

HPLC 进行各个组分分离时，样品引入流动的液体（流动相）中，组分通过一根内部填充直径很小、表面积很大的材料（固定相）的柱子。当组分分子随流动相通过柱子时，组分分子（溶质）与固定相和流动相之间存在持续的相互作用，最终达到动态平衡。不同的溶质分子在平衡过程中的差异导致了混合物中各组分的分离。当流动相中所有的溶剂组成维持不变时进行分离，这个过程称为等度洗脱。如果流动相中一种或多种溶剂的组成随时间连续变化，称为梯度洗脱。当含有被测物分子的流动相区段流出柱子时，会经过一个（或一系列）检测器。检测器的信号响应是流动相区段中组分浓度的函数。这些信号进入数据处理后，绘出信号响应对时间的函数图，信号的图形显示称为色谱图，每个组分区段则识别于色谱峰。这些峰具有以下特征参数：峰宽、峰面积或峰高、拖尾因子和保留时间。仪器装置称为色谱仪。典型的色谱图见图 1。

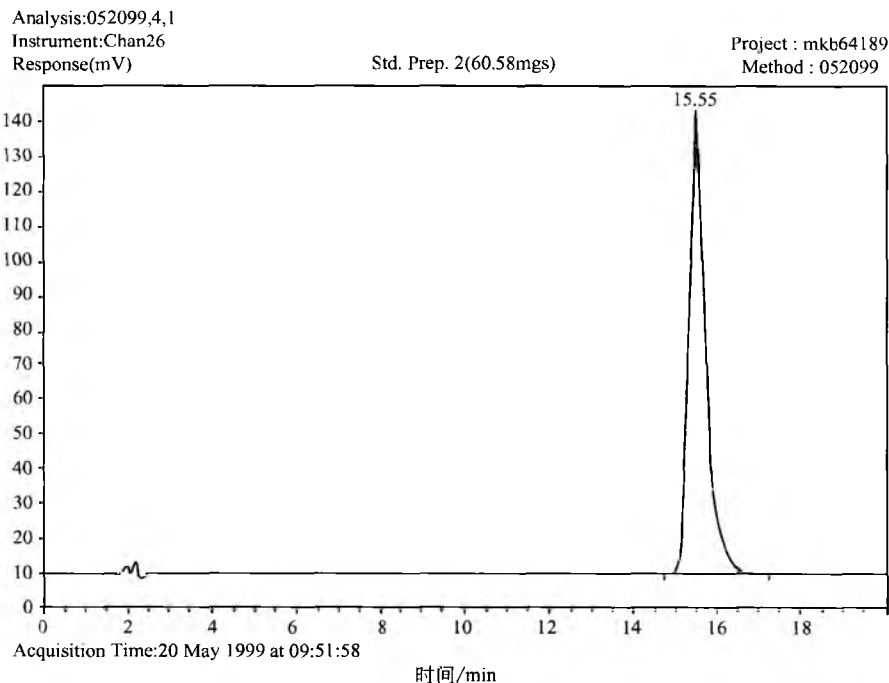


图 1 典型色谱图



在 HPLC 中, 溶质分子进入流动的流动相中。液流从柱子的进口进入, 从出口流出。由于柱内颗粒尺寸非常小 ($10\mu\text{m}$ 或更小), 且柱子被完全填充, 所以流动相必须使用高压泵输入。组分分子仅由流动相携带。与柱表面发生作用的分子被阻留, 与那些作用弱的分子相比, 洗脱带流出更慢。

溶质的相对迁移取决于其热力学和动力学性质。两个相邻洗脱峰的分离程度和质量可以用保留因子 (k' 或容量因子)、选择因子 (α) 和理论板数 (N) 来描述。容量因子是指溶质分子在柱内颗粒中吸附时间与在流动相中存在时间之比。因此, k' 值越大, 溶质与柱内颗粒间的相互作用就越强。容量因子取决于色谱柱性质、流动相中有机相或水相的强度以及柱温。与活性药物保留时间有关的相对保留时间这个实验测定参数可以通过计算得到。在等度洗脱条件下, 最佳的容量因子值为 2~6, 通常 1~10 都是可以接受的。 k' 值越大, 相邻带之间的分离度越大。然而, 随着 k' 值增大, 分析时间延长, 同时因为峰形变宽, 导致检测灵敏度降低。使用梯度洗脱可以克服等度洗脱的这两个缺陷。

如果所有组分都能达到完全分离, 而且峰宽相对较窄, 就可以认为色谱分离过程是有效的。理论上, 当同一分子以窄谱带形式进入柱子时, 出口处的带宽应当不变。然而, 因为不是所有分子都走同样的路径, 所以溶质分子的洗脱时间存在差异。这种差异由以下因素引起: 局部表面面积的差异、作用表面的相对物理活性、缝隙和小孔中是否存在停滞的流动相以及流动相流经表面时轻微的流速差异。不是所有溶质分子都经历相同的过程, 因此可能会使峰形展宽。

此外, 两个相邻流出峰间的分离程度用分离度 R 来评价。

$$R = 2(t_2 - t_1) / (w_1 + w_2)$$

式中: w_1 和 w_2 分别为峰宽, t_1 和 t_2 分别为保留时间, 单位相同。

R 值越大, 分离越好。 R 值为 1.00 时, 如果每个峰都符合高斯分布, 被测物纯度大约为 97.7%。实践中, 峰纯度要达到 99.8% 以上, 分离度至少应为 1.5。

分离效率用理论塔板数 N 来描述, 计算公式如下:

$$N = 16(t_r/w_b)^2 = 5.54(t_r/w_{1/2})^2$$

式中: t_r 为保留时间; w_b 为基线处峰宽; $w_{1/2}$ 为半峰高。通常使用一个色谱柱无关的参数, H [相当于理论塔板的高度, $(HETP) = L/N$, L 为色谱柱长度]。

柱效与色谱柱填充颗粒的大小成反比。因此分离效率按以下顺序排列:

$$E_{3\mu\text{m}} > E_{5\mu\text{m}} > E_{10\mu\text{m}}$$

式中: E 为柱效; 下标为颗粒大小。

HPLC 技术可以用于制备型化学分离。然而, 本章仅限于定量分析分离。在定量分析中, 将已知浓度的标准溶液以已知体积多次进样 (多数药典方法通常要求 5~6 次)。

有关色谱峰的平均峰面积由计算得到。通过比较被测物质与标准物质两者的峰面积, 可以计算出被测物的未知浓度, 这种方法称为外标法。然而, 有时在标准物质和分析样品中加入一个已知化合物, 这样可以计算出被测物的相对峰面积 (有时为峰高) 与所加内标物质的相对峰面积响应之比。通过比较标准物质和被测物的相对响应, 可以计算出未知浓度, 这种方法称为内标法。有时可以用峰高代替峰面积。理论塔板数、相邻峰的分离度、多次进样的相对标准偏差百分数以及拖尾因子 (色谱峰形偏离对称高斯峰的程度) 可作为系统适用性参数。USP24 和其他论著均提供了系统适用性要求的实例, 以及符合相应要求的测试方法。

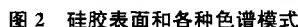
色谱柱和色谱模式

HPLC 的固定相是存放于色谱柱中的固体支持物, 流动相流经固定相会实现各组分的分离。HPLC 色谱柱通常由长 100~300mm、内径 2~5mm 的不锈钢管制成, 内部填充有多孔、多微孔、球形、不规则的颗粒, 或者具有下列性质的特殊涂层颗粒: 平均颗粒大小为 3~10 μm 、表面积为 150~400 m^2/g 、比孔容为 0.2~1.5 cm^3 或 mL/g 、表观密度为 0.4~0.6 g/mL 。不同色谱模式的差异在于填充材料的差异和相应的可适用流动相组分, 以及溶质分子中相互作用的官能团性质间的差异。这些官能团与色谱柱固定相或流动相之间的选择性和专属性作用导致了分离的选择性和专属性。固定相的化学性质可以选择性利用官能团性质的差异, 使用适当的改性硅胶颗粒加以改变, 见图 2。下面将简要介绍各种色谱模式。

1. 正相色谱

在正相色谱中, 使用极性固定相和非极性流动相进行分离。为了提高流动相的极性, 可以加入适当浓度的调节剂, 如甲醇或乙腈。大多数正相色谱柱使用的是酸性和极性的裸露硅胶。酸性的表面硅醇基是亲水性的, 与溶质分子中的各种功能团发生各种不同作用。流动相的亲脂性也会影响溶质在其表面的优先溶解或优先吸附。正相色谱使用的硅胶有以下缺点: ①硅胶的活性取决于产品, 导致分离效果较差, 以及不同柱之间、不同品牌之间的差异; ②强极性溶质在固定相上发生不可逆吸附; ③必须控制流动相中水的含量; ④流动相改变时微粒的重新平衡缓慢。这些问题部分可以使用改性硅胶固定相解决, 在硅胶表面键合适当的功能团进行修饰, 这些功能团可以是氰烷基、氨基或含苯基。

非极性固定相, 如聚苯乙烯/二乙烯基苯共聚物或炭也可作为填料。氧化铝具有极性和酸性, 而二氧化钛和氧化锆都接近中性。与硅胶相比, 它们的水稳定性更好。正相色谱局限于立体异构体、非对映异构体、低相对分子质量芳香族化合物和长链脂肪族化合物的分离。



尽管封尾柱具有以上优点,但是遇水不稳定仍然是个



问题。为了克服硅胶柱的这些问题，人们开发了其他固定相，如氧化铝、氧化锆和二氧化钛等。氧化铝柱在 pH 2~12 的范围稳定，而氧化锆柱的 pH 范围更广，从 0~14。这些都是碱性氧化物，因此可以消除硅醇基式的作用。使用氧化锆可以得到不同键合相，然而由于氧化铝反应性低，难以制备这类键合的固定相。

聚二乙烯基苯和聚苯乙烯的固定相也可以消除这些影响。多孔石墨具有高度非极性的表面，在酸性和碱性条件下化学稳定性优越。然而，与传统柱相比，载样量和柱效均较差。

尽管通过以上的努力，硅胶修饰柱仍广泛使用。许多色谱柱制造商已经建立了硅胶柱合成和特性的质量控制程序。因此，同一厂商批与批之间的差异大大降低。然而，不同厂商的相同固定相色谱柱在相同的仪器和流动相条件下，对同一被测物却会产生不同的分离效果（在测试的 13 根苯基柱中，仅有 3 根对于一个含有 13 种杂质成分的肿瘤药物呈现相似的色谱图。）

3. 离子对色谱

在反相色谱分离中，由于离子化合物具有很好的水溶性，在色谱柱中无法保留。为了增强保留和分离能力，可以在流动相中加入一种强的反离子（具有相反电荷的有机烷基或芳基取代离子），常用烷基磺酸盐或者烷基铵盐。这些反离子与被测物结合（离子对），取代了无机反离子如氟离子。由于离子对类似于大的非极性的中性有机分子，分配进入固定相，被测物得到保留。这种技术又称为离子相互作用色谱，利用 pH、离子强度、流动相有机物含量和温度的影响以控制保留和分离。

4. 离子交换和离子色谱

离子交换固定相由固态树脂颗粒组成，这些颗粒具有与固定相结合的带正电或负电的离子键合点。流动相中带相反电荷的离子与表面离子发生交换。阳离子交换树脂含有以共价键形式存在的带负电的功能团，而阴离子交换树脂含有带正电的功能团。当带电功能团是磺酸基阴离子时，称为强阳离子交换。弱阳离子交换树脂含有羧甲基、磷酸根和磺烷基等功能团。如果树脂中是强碱性季铵盐，称为强阴离子交换。弱阴离子交换树脂含有氨基、二乙基氨基等弱碱性基团。如果这些功能团仅仅存在于固定相的表面，则称为薄膜颗粒（pellicular particles）。使用薄膜颗粒时，较低浓度的洗脱液就足够了。使用薄膜离子交换树脂时，离子交换是唯一的分离方法。当离子因此得到分离时，特别是无机离子或小有机酸阴离子的分离，称为离子色谱。大多数现代离子色谱的固定相使用聚苯乙烯二乙烯基苯共聚物树脂。这种固定相具有极高的 pH 稳定性，耐强酸强碱。

使用离子色谱分离和电导检测时，能够检测无机阴离子，如卤离子、磷酸根、亚硝酸根、硝酸根、硫氰酸根、硫酸根以及许多阳离子，包括过渡金属元素离子。当离子

在弱电导的溶液中进行定量时，由于总背景电导非常小，可以进行电导检测和定量。具体例子包括海水、自来水或天然水中的离子测定。然而，如果使用强酸性或强碱性的洗脱液，背景电导非常高。为了抑制背景电导，应当使用专用的抑制柱，在柱洗脱后进行检测前要中和酸或碱。新型的脉冲电流检测器（PAD）已经商品化。使用 PAD，可以测定 ppb 级水平的金属离子。由于无机标准校准物已经商品化，金属离子的准确定量是已完成的。

当金属离子作为反离子代替填充材料中的有机季铵盐离子时，碳水化合物和其他糖的羟基功能团会与这些金属离子相互作用。填充材料中常用的金属离子有 Pb^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Na^{+} 。根据所用反离子的种类，相互作用的强度会发生变化，因此不同碳水化合物间的保留能力不同。在这些条件下由于分子的大小，某些碳水化合物也能得到保留。

离子交换色谱广泛用于蛋白质、糖蛋白、肽类和其他大分子化合物的分析。这些有机化合物具有相当可观的表面电荷，表现为带阴离子，因此可进行离子交换分离。为了分离分子结构相似的核苷，可以利用不同核苷中磷酸根间的差异和它们键合性质间的差异。除了硅胶树脂之外，丙烯酸聚合物树脂、右旋糖酐和纤维素等键合相可用于蛋白质的分离。为了在分离过程中保持生物活性，可以使用填充离子交换材料的手工装填柱。离子交换的准则是洗脱液在低温下靠重力作用而流动。因此，离子交换色谱和离子色谱不再是同义词。

5. 疏水作用色谱

在疏水作用色谱中，使用弱疏水性的吸附剂。采用这种技术，盐浓度逐渐降低的梯度洗脱可进行大生物分子的分离，特别是蛋白质。生物大分子的非极性官能团可与固定相中的疏水性配体发生微弱结合。固定相由高疏水性的有机层组成，表面附有短烷基或芳基功能团。这些附着的基团被其中较大的未附着空间分开。由于这个宽空间的存在，这种“软”固定相保留了蛋白质的生物活性不致变性。高离子强度水相流动相加强了溶质和固定相间的结合，于是可降低盐浓度以降低流动相的离子强度。弱流动相减小了结合力，从而达到分离。

常用的固定相包括以下几种：聚乙烯吡咯烷酮（PVP）涂层硅胶吸附剂、表面键合酰胺基或醚的单分散无孔硅胶柱以及合成琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶。常用的洗脱液由浓度大于 1.0 mol/L 的盐类组成，包括磷酸钠、硫酸钠、硫酸铵以及有机酸盐，如谷氨酸单钠。易溶于水的磷酸盐、硫酸盐、枸橼酸盐能够增加表面张力，因此与高氯酸盐、硫酸盐等相比，蛋白质的保留更强。

可被疏水作用色谱分离的常见生物样品包括：细胞色素 P450、酶、DNA 聚合酶、表皮生长因子、糖蛋白激素、人免疫球蛋白、人重组 DNA 和犬胰液蛋白。很多 HIC 技术已用于蛋白质的大规模纯化。

6. 亲和色谱

这种色谱技术使用一种特殊的结合剂。通过将一对相

S

相互作用的分子中的一个分子固定在担体颗粒上来制备固定相。固定化的分子称为配体。这些配体选择性结合蛋白质或生物分子中相互作用的另一种分子。例如, 将一个抗转铁蛋白抗体固定在担体上, 在此, 抗体为配体; 生物分子中的抗转铁蛋白抗原与担体表面结合, 或者从表面释放出来, 这就取决于流动相的强度。因此, 这种技术利用两对特殊相互作用基团或组分的亲和力差异, 故称为亲和色谱。

常见配体可能来自生物源, 如抗体、抑制剂、底物、辅酶、辅助因子、核酸等; 也可能来自非生物源, 如三嗪染料、金属螯合物、硼酸盐等。在这项技术中, 使用一种称为“加样缓冲液”的弱流动相将样品注入色谱柱中。此时, 只有相互作用的成分结合在担体表面, 并保留在柱中。其余成分被洗脱出柱。然后使用一种称为“洗脱缓冲液”的较强流动相, 将被测物从柱中释放洗脱出来, 进行定量或收集备用。洗脱可能分开两个步骤, 也可能是单次的梯度洗脱。这项技术用于激素、肽类、蛋白质、病毒、酶、糖肽、抗体、金属结合氨基酸等的分离。亲和色谱可进一步分为生物亲和、生物吸附、免疫亲和等, 这取决于固定相中配体的性质。

7. 体积排阻色谱

体积排阻色谱技术 (SEC) 用于生物分子的分离, 它建立在分子体积的基础上。合成的和许多天然聚合体, 如多糖、纤维素、天然橡胶和一些蛋白质的组分 (单体) 都具有不同相对分子质量的链长。这种混合相对分子质量样品, 称为多分散性聚合物。而单一相对分子质量聚合物称为单相。SEC 色谱峰较宽, 表明多分散性聚合物中不同组分的洗脱。多分散相可用多到 3 个相对分子质量参数描述其分布, 分别是: ①数均相对分子质量, M_n ; ②重均相对分子质量, M_w ; ③ z 均相对分子质量, M_z 。当 $M_n = M_w$ 时, 相对分子质量分布是单分散的。 M_w/M_n 是测量系统的多分散性。对于生物大分子, M_n 和 M_w 不同, 通常 M_w 较高, 因为它对分布中存在的高分子组分更加敏感。 M_n 、 M_w 、 M_z 定义如下:

$$M_n = \sum N_i M_i / \sum W_i$$

$$M_w = \sum M_i W_i / \sum W_i$$

$$M_z = \sum W_i M_i^2 / \sum W_i M_i$$

式中: N_i 为相对分子质量 M_i 的分子数量; W_i 为 M_i 的质量 (或浓度)。 M_w/M_n 或 M_z/M_w 表示分布的宽度。体积排阻色谱是相对的而非绝对的技术。

凝胶渗透色谱 (gel permeation chromatography, GPC) 是一种分离可溶于有机溶剂的聚合物的技术。这种技术使用极性较强的有机溶剂, 如四氢呋喃、甲苯和氯仿等。凝胶过滤色谱 (gel filtration chromatography, GFC) 用于分离水溶性生物聚合物。可以使用 4 种不同的校正方法。如果使用绝对相对分子质量已知的标准物质, 则称为一级校正法 (一法, primary calibration method)。在二级校正法 (二法, secondary calibration approach) 中, 使用与样品相

似的多分散标准物质。结果通常用表观相对分子质量分布来表示。使用复杂的软件进行迭代运算, 获得 M_w 和 M_n 时, 称为宽相对分子质量校正 (三法, broad molecular weight calibration)。所谓迭代运算是使用已知 M_n 和 M_w 值的宽相对分子质量标准物质校正斜率和截距。通用校正 (四法, universal calibration) 是通过 $\log(M_i \eta)$ 对洗脱液体积 V_e 图获得, 其中 η 为被测聚合物在与流动相同温和同溶剂中的特性黏度。这种技术结合使用 SEC 在线黏度计和通用校正。

对于溶解于有机溶剂的聚合物, 可以使用交联聚苯乙烯或硅胶填充材料。对于水溶性聚合物, 可以使用各种硅胶基体和疏水性聚合物填充材料。SEC 填充物的孔径为 3~300nm。

SEC 除折光检测器外, 还可使用专用检测器如在线 SEC 检测器和低角度激光散射检测器, 测定相对分子质量的分布。

仪器

1. 溶剂输送

溶剂 (流动相) 输送是通过高压泵完成的。商品化的泵有几种类型, 将流动相输送通过进样器、色谱柱、检测器, 最后到达废液瓶。由于柱前压力很高, 泵在高压下运作 [50~300psi (1psi=6.894 76×10³ Pa, 下同)]。最常用的泵是具有单向阀的往复柱塞泵, 通常由计算机控制。现代泵的流速精确度可使保留时间的偏差小于 0.1%。

对于梯度洗脱, 至少必须泵入两种溶剂, 并在柱前混合。溶剂组分以连续线性、连续非线性或者步进的方式改变。溶剂采用比例阀进行混合后进入泵。由于溶剂混合是在泵前低压条件下进行的, 所以称为低压混合, 这是梯度洗脱中最常用的混合方式。在高压混合中, 两种或更多的溶剂由不同泵各自泵入, 接着在高压下混合。泵头渗漏是这种泵的常见问题。为了防止渗漏, 泵头必须经常检查或维修。

流动相溶剂中溶解的氧必须除去, 可以通过将氦气通入溶剂瓶中, 或者将流动相通过氦气脱气装置完成。目前, 计算机不但能控制泵, 还能控制位于泵与贮液瓶之间的真空脱气机。

2. 自动进样器

自动进样器用于无人看管时的进样, 样品瓶事先排列在矩形或圆形进样盘中。自动进样器可以输送 1~2.5mL 体积的溶液, 当进样体积大于 10μL 时, 精密度小于或等于 0.5%。所有的自动进样器都使用机械阀。多数 HPLC 的自动进样器都不外乎两种类型。在第一种类型中, 注射针头穿过隔膜帽, 液体通过气压或活塞进入注射器中, 到达六通阀进样器的进口。通过合适的电子机械装置, 充液的注射器缩回、移动, 将溶液注入流动相液流中。第二种类型

自动进样器除了样品定量环内可部分填充和输送样品液外，其工作方式与第一种非常相似，此外与第一种类型相比，小体积进样时的精密度高。如果两次进样之间进行的循环清洗或清洗溶剂不适当，两类自动进样器都会存在溶液残留问题。

3. 检测器

液相色谱检测器由传感器和一个将信号传送到处理器中的相关的电子装置组成。检测器可分为总体性能检测器 (bulk property detector) 或者溶质性能检测器 (solute property detector)。总体性能检测器测量的是整体综合洗脱流动相和洗脱溶质的性质变化。例如，折射率是液体的特性参数。当溶质溶入时，溶液的折光率与溶剂的折光率是不同的，这就改变了总体溶液的性质。虽然变化是由于溶质的存在而产生的，但是作为整体的总体折光率与纯溶剂的折光率就不同了。折光率检测器和电导检测器都属于总体性能检测器。溶质性能检测器检测的是流动相中洗脱组分的某些物理化学性质变化。

3.1 HPLC 检测器

HPLC 检测器应当具有以下特点：①对溶质浓度具有优越的线性响应；②宽线性动态范围，与所覆盖浓度的响应呈线性；③高信噪比。流动相温度、压力或流速的变化会引起信号的波动或紊乱，从而产生噪音。检测系统中使用的电路也会引起噪音。总的这些紊乱统称为噪音，应当足够低，使极低浓度的溶质也可检测。

3.2 折光率检测器

最常用的折光检测器 (RID) 是差示折光计，对光束的偏转具有响应；偏转是由于洗脱液通过池的折光率与含有流动相的池的折光率之间的差异引起的。检测器的响应与质量浓度呈正比，与被测物的性质无关。

3.3 电导检测器

电导检测器是测量电解质溶液的电导率。当电流通过两个电极时，流经介质时存在电阻（或阻抗）。洗脱液中存在导电电解质时阻抗下降。这种检测器多用于离子色谱。与离子抑制技术联用，它已经成为测定分析物中低浓度无机离子含量的通用检测器。

3.4 紫外-可见光检测器

紫外-可见分光光度检测器是 HPLC 中最常用的检测器，因为大部分有机化合物在紫外光区 (190 ~ 400nm) 具有光吸收，部分化合物在可见光区 (400 ~ 750nm) 具有吸收。固定波长、可变波长和二极阵列检测器都已经商品化。所有这些检测器都是基于溶质分子中存在的化学结构和官能团能够使其在特定波长处吸收光。紫外光源为氘灯或者高压汞灯，而可见光区使用钨灯。

光束通过位于色谱柱末端的流通池。当溶质分子从柱

中洗脱出进入流通池时，会吸收光，并促使光能量发生变化，可作定量测定。固定波长检测器在单个波长处工作，一般为紫外区的 254nm 或 280nm。在可变波长检测器中，使用一个单色仪，选择特定波长（小于 $\pm 3\text{nm}$ ）的光通过样品，到达用于检测的光电池。目前的检测器可以设置程序改变波长，在分析过程中也可以同时获得洗脱物的光谱图。另外，使用合适的软件，可以在 2~4 个不同波长处同时监测洗脱物的吸收。与固定波长检测器相比，多波长检测器的灵敏度较低（后者为 10^{-7}g/mL ，前者为 $5 \times 10^{-8}\text{g/mL}$ ）。

3.5 光电二极管阵列检测器

二极管阵列检测器能够在 190~800nm 的整个紫外可见光区范围内采集数据，有的甚至可达到 1100nm。市场上销售的光电二极管阵列检测器有两种。为了能够在整个光谱范围内检测，在第一种中使用快速旋转或振动光栅，使连续光源发出的光通过流通池，每次一个波长。在测量周期内，测量的光检测器信号随时间变化。这样，波长与时间有关，可以从测量周期中得到波长-信号图。在第二种检测器中，全色光通过流通池，接着通过全息光栅。光栅中散射出的光落在线性光电二极管阵列中。这种二极管阵列检测器属于通用型，可用于：

- 使用“峰重叠 (peak overlay)”（归一化）法或者计算两种不同波长处的峰比值检查纯度；
- 通过累积的保存光谱库进行光谱匹配，来鉴别峰；
- 生成洗脱峰的光谱图，决定未知峰或杂质峰的最大吸收波长；
- 在单次色谱分析中，在不同波长处进行不同峰的定量；
- 向管理机构提供 3D 图或者等高图，显示洗脱色谱峰的纯度；
- 在方法优化过程中，当化合物的洗脱顺序改变时，用来鉴别峰。

值得注意的是，这类检测器的灵敏度均低于固定或可变波长检测器，而且，如果一个杂质峰重叠于洗脱峰的前沿或尾部，只有杂质浓度高于主峰浓度的 2% 时才能被检测。

3.6 荧光检测器

由于荧光检测器的灵敏度极高，可以用于皮克级 (picogram, 10^{-12}) 样品的检测。然而，这种检测器只适用于本身具有荧光的化合物，或者可以通过与合适的衍生化试剂反应产生荧光的化合物。后者要求溶质分子中必须存在可发生这种衍生化反应的合适功能团，因而本方法受到限制。在使用这项技术的许多 HPLC 方法中，通常在组分分离后加入荧光试剂。它的优点是衍生化无需定量完成，但是反应必须非常迅速、具有重现性且与浓度成正比。由于仅与溶质的性质有关，使检测具有选择性和专属性。

3.7 电化学检测器

这也是一种非常专属、极其灵敏的检测器。专属性来

S

自于溶质分子中必须存在可以电氧化或电还原的功能团。与荧光检测器相似,溶质分子能够经衍生化产生含有可氧化性(或很少为可还原性)的功能团。在与流通池连接的工作电极和参比电极之间施加一个电位。作为辅助电极的第三个电极用于控制电位。当氧化反应发生在工作电极表面时,电流会发生改变,这可以使用合适的软硬件进行监测、放大和产生响应。当氧化反应在工作电极的大表面中完成,且耗尽流通池中的所有反应物时,称为库仑检测器(coulometric detector)。在这种情况下,可以测定转移电荷的总库仑数。然而,在最常用的电流检测器(amperometric detector)中,通过维持工作电极在一恒定电位处,表面的溶质分子和邻近表面的溶质分子被氧化。氧化过程是扩散控制的,与浓度成正比。此时若电流增大,将其测定、放大和表示为随时间变化的信号。玻碳电极是最常用的用于氧化反应的电极。表面涂层以及由此产生的表面污染物会使经常使用的灵敏度降低。因此,这种检测器应可拆卸,必须经常清洗。与其他检测器相比,这种检测器同时也需要很长的平衡时间。因此,与本文介绍的其他检测器相比,应用不广泛。在脉冲电流检测器(PAD)中,电极污染问题得到解决。在这项技术中,使用一种金电极或铂电极,施加重复循环的电位脉冲。典型的是在1s脉冲循环中施加三次电位脉冲。在初始负脉冲中,溶质被吸附;在第二个正电位脉冲中,吸附的化合物被氧化所致的增加的电流值予以测定。在第三个高得多的正电位脉冲中,电极表面被自身的氧化反应清洗,因此产生的新表面用于重复循环过程。对于极低浓度的糖类,以及不易被氧化的其他多羟基化合物的检测,这项技术非常有用。

3.8 蒸发光散射检测器

在这种检测器中,来自柱内的全部洗脱物发生雾化,蒸发形成小液滴。最后剩余的溶质形成悬浮于雾化气中的微粒。当这些微粒通过光束时,光被微粒向各个方向分散,这就是瑞利(Rayleigh)散射。然而,只有与入射光成 45° 角的散射光才能采用合适的滤光器进行观察,经电子处理得到信号。这种检测器的响应对溶质颗粒的质量非常灵敏,因此它是通用型检测器,灵敏度与RID相当。

4. 计算机

计算机的普遍使用,已经成为实验室不可缺少的工具。它同时具有数据处理和过程控制功能。作为数据处理器,计算机能够接受、储存、归档和再处理不同检测器的输入信号。此外,作为系统处理器,计算机能够监测系统检测器。每次色谱分析获得的数据经恰当处理后,可得到峰面积、或峰高、或与内标物质的响应比。由此可计算被测物中各组分的浓度。

通过使用合适的软硬件,计算机具有以下功能:①控制进样;②控制监测泵的各种参数,如流速、流动相组分、柱压;③监控柱温、检测器温度;④启动和停止进样器、检测器和其他系统单元。计算机也可用于监测系统适应性

参数,调整条件后重新进样以符合系统适应性要求。当预先设定的系统不能满足适应性条件时,可以创建决策树形图进行重新测试。计算机还能够设定程序,如果条件不符合,系统会关闭或暂停直至符合为止。样品制备、衍生化和其他过程也可以用个别的计算机控制。将多台计算机连接到一台称为服务器的大型计算机上,能够监测、储存和归档来自于大量检测器的数据。计算机也可用作高级记事本,储存关于样品、测定结果等信息,以及获得这些结果的实验条件。计算机在高标准管理的制药工业中成为通用工具,特别是为政府和法定机构如FDA、USP、BP等提供可溯源的完整数据。

方法开发和方法验证

方法开发过程是指为分析样品选择合适的方法条件。这建立在预先了解样品的性质、功能团的 pK_a 或 pK_b 、溶质分子的极性和大小、紫外可见光谱性质、氧化还原行为、浓度范围、溶解度以及其他方面性质的基础之上。根据这些知识,就可以选择合适的色谱模式、相应色谱柱、流动相组分、流速、检测器选择、梯度或等度洗脱条件和其他条件。经初步试验,一旦方法建立,就可以进行优化工作。优化是非常必要的,可以使所有组分在尽可能短的时间内,或者在低检测限下实现最佳分离,务必做到优化后的条件可以达到检测要求和(或)定量要求。一般来说,在进行方法验证前,须对系统适应性参数进行评价和规定。

方法验证是指准备文件资料,证明方法符合要求的过程。为了符合政府机构(如FDA、EPA的法定要求)和(或)为法定机构(如USP、BP等)提供数据,高水平管理的药物分析实验室均执行方法验证,提供下面有关参数的数据。

验证的参数包括准确度、精密度、专属性、线性、严格性和耐用性。

准确度指评价测量值与真值或可接受的参考值之间的接近程度。通常在一种称为安慰剂(placebo)的基质中加入已知量的被测物,分析样品后计算被测物的回收率。安慰剂中含有制剂中除活性组分或被测组分以外的所有组分。FDA和ICH(International Committee on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human use,人用药品注册技术规定国际协调会议)的指导原则建议在被测物的浓度范围附近至少采集3个浓度的9个测定数据。

精密度是指在方法规定的条件下的重现程度,用具有统计意义分析样品数量的相对标准偏差百分数(%RSD)来表示。精密度提供了常规分析中的日间、分析者间和仪器间的偏差程度。提供的精密度数据可以是标准偏差、%RSD、置信区间,也可以包括实验室之间的偏差。

专属性是指高置信水平地测定被测物浓度的能力,基质中的其他组分对目标分析物没有干扰。潜在的干扰物质包括其他活性组分和非活性组分、杂质、活性组分的降解



产物以及密闭容器系统中的可抽出物等。专属性是管理机构当前流行的术语。在文献中,选择性也是指专属性[参见 USP XXII (1900) 对 USP XXIII (1995) 和 USP 24 (2000) 的<1225>]

线性是指检测器在规定范围内对被测物浓度的线性响应。范围是指被测物较低浓度和较高浓度的区间,其单位与分析试验结果的单位相同。为了表达线性,通过一定范围内至少 5 种不同浓度点绘制响应-浓度图。另外,还应提供回归线的斜率和截距以及相关系数。一般来说,如果截距非常接近零,推荐使用单个标准物质。否则,通常推荐使用多个标准物质得到的线性曲线进行定量。

严格性也是指精密度测量。ICH 指导原则将严格性包括在精密度中,而 USP 中则是分开的。根据 USP 要求,严格性是指多个实验室之间比对数据的差异程度。它是为了建立试验结果不受基于一定的操作参数和环境参数的影响。

耐用性是指流动相的有机含量、pH、离子强度和柱温等参数蓄意使之发生细微变化时,测定结果不受影响的承受程度。组分的分离度、方法的准确度和精密度等不应随这些细微变化而改变(笔者的观点是,耐用性应当是方法开发过程的一部分,与色谱柱和流动相条件的恰当选择有关)。

另外两个术语,定量限(LOQ)和检测限(LOD)专门用于痕量测定。痕量级的被测物可能是样品中的杂质或者降解产物,也可能是洗针时带入的痕量活性组分溶液,或者是清洁验证部分的残留样品。LOD 是指一定色谱条件下所能检测(但不是定量)的被测物最低浓度,通常用信噪比为 3:1 时计算的浓度来表示。LOQ 是指在一定的精密度要求前提下,能够进行定量的被测物最低浓度,LOQ 通常可接受的信噪比为 10:1。一般来说,为了确保 LOD 值和 LOQ 值具有重现性,两者均有专门规定。例如,专门规定使用 0.1% 标准替代品测定 0.05% 的杂质,或者 ppm 级定量,或者由仪器清洁程度决定检测限。在实际操作中,推荐制备一个已知被测物浓度的控制溶液,这样被测物浓度所对应的色谱峰总是能够被检测(LOD)或定量(LOQ)。如果通过实验获得了其中一个参数,那么可以计算出另一个。

注意事项

1. 样品制备

对于多数分析,样品制备可能仅包括溶解已知质量或体积的样品,稀释到合适的分析浓度等。然而,如果进行柱前衍生化,就需要额外的样品制备工作。柱前衍生化可以提高灵敏度,产生专属性,或者分离光学异构体,以及减少或消除其他复杂昂贵的净化程序。在生物样品的净化过程中,通常使用合适的固体小柱进行固相萃取。固相小柱也可用于提高痕量被测物的浓度。这些纯化步骤可以通过合适的管路装置在分析过程中在线完成,通常是使用六通阀或十通阀,并使用计算机控制泵和阀。无论如何处理,

都必须注意采取合适的取样和制备方式。

2. 流动相制备

流动相的制备应当使用 HPLC 级溶剂和分析纯化学试剂。流动相应使用滤膜($\leq 0.5\mu\text{m}$)过滤,去除溶剂中可能存在的微粒物质。为了去除溶解的空气,应当通入氮气或进行真空脱气。在梯度洗脱中,为了不改变固定相的润湿和凝胶性质,建议使用水含量至少为 5% 的溶剂代替纯有机溶剂,作为流动相之一。

3. 系统维护

泵和色谱柱应当用 50:50 的甲醇-水或乙腈-水混合物进行清洗,以去除系统中的缓冲液。泵、进样器和检测器需要有计划地进行周期性维护,确保仪器处于良好的工作状态。检测器应当使用 NIST 提供的或来源于 NIST 的合适校准物质进行校准。FDA 和其他管理机构要求提供关于仪器完好状态的详尽记录文件。因此,与维护工作有关的文档应当保存。如果仪器发生故障,也需要提供额外的文件,以证明测定结果未受影响,或者由于仪器故障而作废。

参考书目

- Barth, H. G.; Boesm, B. E.; Jackson, C. Anal. Chem. 1998, 68, 455—466.
- Berthod, A. J. Chromatogr. 1991, 549, 1.
- Bidlingmeyer, B. A. J. Chromatogr. Sci. 1997, 35, 392—400.
- Brown, P. R., Grushka, E., Eds. Advances in Chromatography; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1998; 39.
- Hanson, M.; Unger, K. K. LC-GC 1997, 15, 364 — 366, 368.
- Katz, E., Eksteen, R., Schoenmakers, P., Miller, N., Eds. Chromatographic Science Series. Handbook of HPLC; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1998; 78.
- Katz, E. D., Ed. High Performance Liquid Chromatography: Principles and Methods in Biotechnology; Wiley; Chichester, UK, 1996.
- Kissinger, P. T. J. Pharm. Biomed. Anal. 1996, 14, 871—880.
- Krull, I.; Swartz, M. LC-GC 1997, 15, 534 — 536, 538, 540.
- LaCourse, W. R.; Dasenbrock, C. O. Analytical Reviews 1998, 70 (12), 37R—52R, 251R—278R; 591R—644R.
- Lloyd, D. K. High Perform. Liq. Chromatogra 1996, 114—142.
- Lough, W. J., Wainer, I. W., Eds. High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice; Blackie; Glasgow, UK, 1996.
- Mant, C. T., Hodges, R. S., Eds. High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins; Separation, Analysis and Conformation; CRC Press; Boca Raton,

S

- FL, 1991.
- Neue, U. D. HPLC Columns: Theory and Practice; Wiley-VCH: New York, 1997.
- Noctor, T. High Perform. Liq. Chromatogr. 1996, 97—113.
- Raghavan, R.; Joseph, J. C. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Swarbrick, J., Boylan, J., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1993; 7, 249—298.
- Riley, C. M., Rosanske, T. W., Eds. Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Development and Validation of Analytical Methods; Pergamon Press/Elsevier Science: New York, 1996; 3.
- Rothman, L. D. Anal. Chem. 1996, 68, 587—598.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Galajch, J. L., Eds. Practical HPLC Method Development, 2nd Ed.; Wiley: New York, 1997.
- Swadesh, J., Ed. HPLC: Practical and Industrial Applications; CRC Press: Boca Raton, FL, 1997.
- Swartz, M. E.; Krull, I. D. Analytical Method Development and Validation; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1997.
- U. S. Pharmacopeia 24/National Formulary 19, United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD, 2000.
- U. S. Pharmacopeia XXIII/National Formulary XVIII, United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD, 1995.
- U. S. Pharmacopeia XXII/National Formulary XVII, United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD, 1990.
- Weston, A.; Brown, P. R. HPLC and CE: Principle and Practice; Academic Press: San Diego, CA, 1997.

(陈燕 陈阳 译)

色谱分析技术：气相色谱法

Isadore Kanfer

Roderick B. Walker

Michael F. Skinner

Rhodes University, Grahamstown, South Africa

引言

1. 历史

“Chromatography”一词起源于希腊语“chroma”和“graphein”，意思分别为“颜色”和“描写”，或者为“颜色描绘”。Tswett最早使用这个术语^[1]，他使用一根由吸附剂粉末制成的色谱柱，用一种称为流动相的液体溶液洗脱，分离出植物色素的色带。用气体代替这种液体流动相，奠定了气相色谱法（GC）的基础，被分离物质经气化后进入一种长型管路，管路中有一种固定不动的固相或液相，也就是固定相。气态流动相以一定的速度驱动被测物蒸气流经色谱柱，这个速度取决于几个因素，其中最重要的是温度。

Martin 和 Synge^[2]于1941年首次报道了采用气体作为流动相，他们利用的是分配色谱的原理，而 James 和 Martin 于1952年首次应用气液色谱法（GLC）分析脂肪酸和胺类^[3]。另外，气体吸附色谱法（GSC）采用固态固定相，分离建立在吸附机制上。1947年，Prior^[4]经 Cremer 教授指导，在其博士论文中首次介绍了这项技术，并于1951年发表^[5]。

然而，1955~1956年，第一台商品化的气相色谱仪才出现^[6,7]。随着新型检测器如火焰离子化检测器^[8,9]的出现、毛细管色谱柱的发展^[10]以及程序升温 and 微量注射器进样等技术的引入^[6]，仪器化得到快速发展，GC法的应用越来越广泛。

2. 用途

GC法作为一种分析技术的出现对有机化合物的定性定量分析产生了深远的影响。通过将色谱柱中的保留时间与已知标准品的保留时间进行比较，或者根据色谱分析前的样品处理进行推断^[11]，或者通过保留指数这一概念^[12]，可以采用GC法进行化合物的鉴别。最后一种方法以及相应条件下的保留指数表^[13]已有报道^[14]。尽管用于化合物鉴别的定性数据和分析方法已经建立^[15,16]，同时超过600种物质的相对保留数据也已经发表^[17]，但是GC法的主要用途毫无疑问在于分离和定量的强大联合。用于定量分析时，两种功能同时作用，也就是组分分离和随后的定量测定。

GC法于1960年首次被《美国药典》（USP）16版^[18]

收载，并于1968年成为《英国药典》（BP）的法定方法^[19]。GC法在药物分析中得到了广泛应用，包括原料药的纯度控制、制剂的含量和质量评价（包括药物稳定性）以及生物样品中的定量测定等。前述的最后一种应用对于治疗药物监测、药物动力学研究和生物利用度评价等非常重要。实际上，纵观GC法的应用^[20]，主要是在药学领域中。

本章于几年前首次撰写，当时，随着高效液相色谱法（HPLC）在药物分析中的应用，GC的应用略有减弱。然而，FDA和世界上其他管理机构在药物批准的新规定中，对有机挥发性杂质（OVI）以及其他杂质和有关物质检查的要求越来越严格^[20]，结果GC法在现行药典中的使用越来越广泛，如USP24^[21]和BP1999^[22]。翻阅现在的USP发现从USP22到现在，越来越多的GC法应用收入USP。本章以表格形式将这些新内容加以介绍。同样，BP^[22]的最新版本也收载了许多新应用。BP（包括《欧洲药典》）中收载的采用GC法的化合物将在附录中单独列出。

对于热稳定的挥发性化合物以及那些由于检测器限制或者分离度不够而难以采用HPLC法测定的药物，GC法是一种很好的选择。GC中使用毛细管色谱柱可以较容易地获得极高的分离度，使得GC法对复杂的多组分分析特别具有吸引力。

3. 操作方式

如前所述，GC是一个两相系统，主要由固定相〔固态和（或）液态〕和流动相（气态）组成。当使用液态固定相（GLC）时，液体以一种薄膜形式固定于一种超细粉碎的惰性固态担体上，这种担体通常由硅藻土、碎耐火砖、玻璃珠等组成，有时还可以固定于一种玻璃管内壁上。在GSC中，固定相是一种活性吸附剂，如氧化铝、硅胶或者石墨，紧密填充于管中。

样品从色谱柱进口处进入，然后随气流流经整个色谱柱，传输过程中在固定相和流动相之间发生分配或者动态吸附（或者两者同时存在），从而使各组分产生分离。各组分分离的程度和速度由几种因素决定，如温度、气体流速和被分离组分各自的物理化学性质以及固定相的物理化学性质，受流动相的影响较少。因此，很明显，分子与固定相的结合力越强，在该相发生吸附或者分配所需的时间越长，从而从色谱柱中流出的时间越长。

各组分从色谱柱出口流出后，进入检测系统，产生一种与被测定组分质量有关的信号。这种信号通常经电子放

大后,记录在图形记录仪、积分仪中,或者由在线数据系统采集。所得响应以信号-时间曲线或者色谱图的形式表达出来,用于定性或者定量分析。

理论基础和速率理论

本章另有小节对色谱理论进行了全面介绍^[23],因此,下面的讨论将专门集中于 GC 理论。混合物中各组分的分离取决于色谱柱性能(柱效)和固定相的相对保留能力(选择性)。前者决定了峰宽,与组分在色谱柱中的保留时间有关,而后者则决定了各流出组分的相对位置(分离度)。

当样品以蒸气形式进入色谱柱时,会形成一种窄谱带。在流经色谱柱的过程中,各种因素影响着谱带宽度,这个

宽度由于各种分散过程而不断增加。分散过程包括溶质分子的扩散、两相间传质的阻力以及不规则流动和扰动的影响^[24]。理论塔板数这一简单的概念来自于蒸馏过程,被用来比较色谱柱和反映影响带宽的分散程度。一根色谱柱可以认为由大量理论塔板组成,样品组分在其中发生固定相和流动相之间的分配。因此,根据下面公式计算色谱柱的理论塔板数,就可以获得色谱柱的柱效。

$$N = 16 \left(\frac{t}{W} \right)^2 \text{ 或者 } N = 5.54 \left(\frac{t}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (1)$$

式中: t 为被测物的保留时间; W 为色谱峰基线处的峰宽,可以通过将相应峰外推至基线处获得(在相应峰两侧进行切线外延); $W_{1/2}$ 为半峰宽,见图 1。

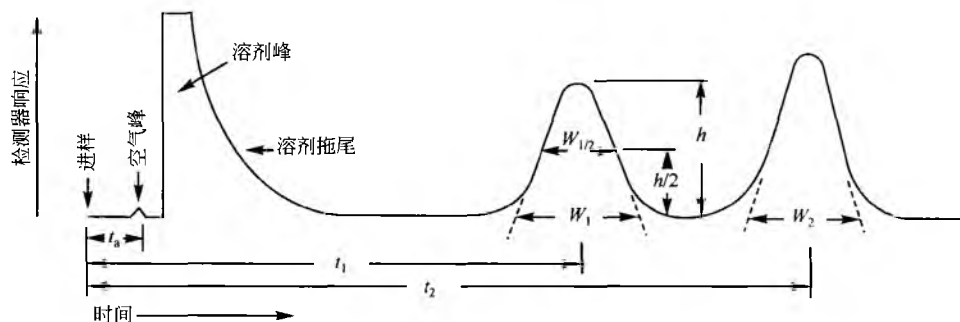


图 1 两种物质的色谱分离

色谱柱的 N 值越大,柱效越高。对于高柱效色谱柱,只需少量样品在较低柱温下进入较短色谱柱,就可以在较短时间内实现高度分离。

不同条件下的柱效或者不同色谱柱的比较可以通过理论塔板高度(HETP)来评价。因此, $HETP = L/N$, 其中 L 为色谱柱的长度。Van Deemter 等^[25]推导出一个色谱分散的方程:

$$HETP = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_g}{\mu} + \frac{8k'd_f^2}{\Pi^2(1+k')^2 D_l \mu} \quad (2)$$

式中: λ 为一常数,与色谱柱填充颗粒几何形状有关; d_p 为固定担体颗粒的平均直径; γ 为色谱柱气体通路曲率的校正因子; D_g 和 D_l 分别为被测物分子在气相和液相中的扩散系数; d_f 为液膜(固定相)厚度; k' 为被测物分子的分配系数; μ 为气体的线性流速^[26]。因此, Van Deemter 方程表明了对于特定的色谱柱, HETP 是流动相的平均线速度 μ 的函数,该方程具有一般形式:

$$HETP = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (3)$$

式中: A 为涡流扩散项,来源于色谱柱填料内流动的不一致; B 为分子扩散项(B 除以 μ , 反映固定相内的轴向扩散); C 反映固定相内的传质阻力。气体的线速度 μ 可以由下式获得:

$$\mu = \frac{\text{色谱柱长度}}{\text{无保留组分(如空气)的保留时间}} \quad (4)$$

对单组分而言,当 HETP 对 μ 作图时, Van Deemter

在方程中三项的流动依赖性可以得到如图 2 所示的双曲线,最小值即色谱柱柱效最佳时的流速。图 2 也表明了 A 、 B 和 C 三项对 HETP 值的贡献。为了达到最大柱效,这三项均必须达到最小值,也就是说使 HETP 值尽可能小。参数 A 的最小化可以通过在小内径色谱柱中装填细小均一的填料颗粒而轻易实现,即通过减小颗粒直径 d_p , 降低 HETP 值。然而,当颗粒大小低于一定值时,流经色谱柱的载气流速受到限制,结果压力升高,从而限制了颗粒进一步减小。 λ 是衡量色谱柱填充颗粒不规则性的指标,颗粒的大小和形状越均一, λ 值越小。

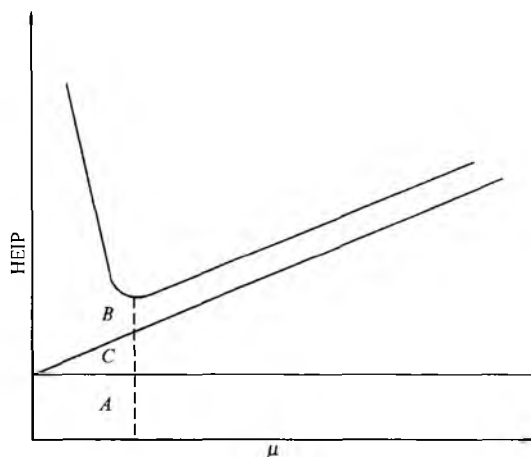


图 2 HETP 值与线速度的关系图

参数 B 与载气中被测物分子的扩散程度有关。分子扩散程度提高, 谱带宽也可增加, 然而, 可以通过增加载气压力使其控制在一定水平。使用高相对分子质量的载气可以阻止扩散, 从而得到最佳的柱效。然而, 检测器性能可能会受所用载气种类影响, 因此, 权宜之计通常是使用氢气或氦气, 虽然柱效可能略有下降, 但是可以实现快速分析。前述气体能够在固定相中快速扩散, 流速通常要高于另一种常用载气——氮气。

余下的参数 C 反映了被测物分子从固定相到气相中的传质, 取决于几个可变因素, 包括被测物从液相到气相的转移以及相反过程。因此, 降低液相膜的厚度, 可以实现更低操作温度下的快速分析, 尽管样品容量将减少。液态固定相的黏度也会影响传质, 因此应当使温度尽可能低。

Golay^[10] 和 Giddings^[27] 分别建立了适用于毛细管色谱柱(内壁涂有液膜的中空管)的改良速率理论和随机游动非平衡理论(random walk, nonequilibrium theory)。前者推导得到一个反映空心柱柱效的方程, 而随机游动理论则以统计矩的概念来描述色谱分离。非平衡理论用严格的数学推导来说明两相间的不完全平衡^[28]。

选择性是固定相和被测物蒸气间相互作用的性能函数。选择合适的液态固定相甚至能够实现具有相同蒸气压的化合物之间的分离。因此分离度由各个被测物在固定相中的溶解性决定。据此, 分配系数 k 是一个极为重要的参数, 可以由下列关系给出:

$$k = \frac{\text{液相中溶质的浓度}}{\text{气相中溶质的浓度}} \quad (5)$$

固定相对于指定分离的性能可以通过相对保留 α 来度量, 即两个校正保留时间的比值(图1):

$$\alpha = \frac{t_2 - t_a}{t_1 - t_a} \quad (6)$$

式中: t_2 是一个组分的保留时间; t_1 是相同分离条件下相同色谱柱测得的另一个组分或者参比组分的保留时间; t_a 是无保留物质比如空气的保留时间。由此可见, α 反映了相同条件下两个被分离组分分配系数间的比值, 当其中一个组分为参比标准物质时, 可作为化合物鉴别的有用参数^[21]。为了表示两个色谱峰实际分离的程度, 可以由图1测得分离度 R , 即

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 + W_1} \quad (7)$$

式中: t_2 和 t_1 分别是两组分的保留时间; W_2 和 W_1 分别是对应色谱峰的基线峰宽。分离度反映了色谱柱和固定相的性能, 将峰宽和最大分离度关联起来。为了使两个色谱峰达到完全分离(基线分离), R 值不得低于 1.5。

系统组成和设备

1. 气体

虽然原则上任何气体都可以作为 GC 的载气, 但是先决条件是该气体在操作温度下对样品和固定相保持惰性。

载气在分离过程中扮演着重要角色, 真正影响系统的性能, 正如 Van Deemter 方程所示, HETP 值取决于被测物在气相中的扩散程度。然而, 实际上, 由于载气的选择通常受检测器的限制, 因此这个角色的重要性在一定程度上有所降低。氦气可以作为热导检测器(TCD)的载气, 与氮气相比, 可以获得更高的灵敏度。另外, 采用氮气或氦气-甲烷混合气作为载气时, 电子捕获检测器(ECD)会更加有效。使用氮气或氦气作为火焰离子化检测器(FID)的载气时, 灵敏度没有明显差异^[29]。热离子检测器(TD), 如氮磷检测器(NPD)使用氮气或氦气作为载气。同样, 光致电离检测器(PID)使用不含氧的氮气或氦气, 而氮气通常作为火焰光度检测器(FPD)的载气。作为 GC 载气的所有气体都必须具有高纯度。Perretta^[30] 深入讨论了 GC 载气纯度的影响, 而“高纯”气体的制备方法以前就已经出版^[31]。微量烃类的存在会降低检测器(FID)的灵敏度, 微量水会使色谱柱中的污染物释放出来, 从而导致高背景信号和“鬼峰”, 而微量氧会使某些液态固定相发生降解, 如聚醇和聚酰胺, 从而使被测物的保留时间发生变化。在气体钢瓶和仪器之间的管路中配备一个装有合适分子筛的干燥筒, 可以除去可能存在的水分。这类过滤装置也可以去除其他微小的痕量污染物, 比如低相对分子质量烃类, 该装置在低速氮气流中加热数小时可以再生。脱氧器可以保护固定相发生氧化降解^[32]。

2. 流速控制

载气经压力调节器进入气相色谱仪, 而流速控制器则用于控制气体流量。在定性定量分析中, 为了使被测物洗脱具有良好的重现性, 维持精确恒定的载气流速非常重要。通常, 特别是在程序升温过程中, 随温度升高由于气体黏度增加、柱背压升高, 载气流速将降低。因此, 差示流量控制器可用来确保流量恒定, 与色谱柱的阻力无关。此外, 检测器通常也需要控制气体流量, 可以通过一个与流量限制器工作原理相反的压力调节器而实现。在色谱柱的末端接上一种皂膜流量计或者使用转子流量计, 可以简易测定气体流量。以前流量控制是手动调节的, 而现在各厂商均提供软件和相关硬件, 实现自动操作。

3. 进样口

人们设计了各种不同的进样口系统, 基本目的都是使样品更容易达到良好的气化, 随后在尽可能最短的时间内, 以一种精确且重现的方式, 将样品“塞”入色谱柱中。进样时还应当注意在进样过程中维持恒定的载气流速和恒定的温度。然而, 进样方式和实际进样系统之间存在着较大差异, 这与使用的是填充柱还是毛细管柱有关。因此, 必须考虑样品的进样体积, 通常填充柱为 1~10 μL , 而毛细管柱则低几个数量级。填充柱的进样口系统通常由一个进样加热块组成(图3), 端口用一种特殊的橡胶隔膜密封, 从而使死体积最小化(降低谱带展开), 进样针则可以穿过隔膜。对热敏感和与金属表面接触时不稳定的化合物, 可

以使用玻璃衬管加以保护,从而最大限度地减少样品与金属进样块的接触时间。

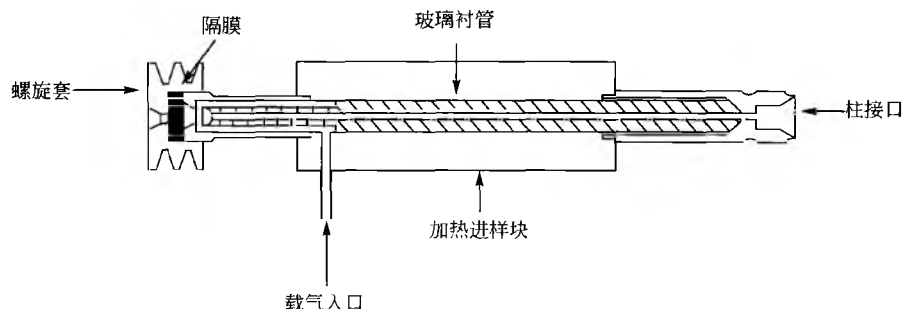


图3 进样块

上述讨论与快速气化进样技术有关,样品首先进入一段柱前区域内,该区域温度比柱温高 $30\sim 50^{\circ}\text{C}$,这样更加有利于样品的瞬间气化。样品也可以采用柱上进样方式,即直接将样品注入色谱柱头内,与快速气化进样相比,结果的精密度更高^[33,34]。

填充柱的进样口系统通常也可以用于毛细管柱。然而,使用毛细管柱时,进样体积更少,载气流速更慢,尤其是小口径的空心毛细管柱(直径 0.25mm),此时需要各种不同的进样技术。

3.1 分流进样

早期的毛细管进样口采用一种进样口分流器,将样品分成两个不相等的部分,较少的那部分进入色谱柱。这种进样口分流器的主要功能是不但可以重复导入色谱柱的样品量,而且可以对进样室进行快速冲洗,这样色谱柱中的样品可被纯净的载气带走,从而避免了样品的稀释^[35]。较多的那部分样品则被排出系统,两部分流量的比值,即分流比,通常为 $1:10\sim 1:500$ 。由于分流进样是一种快速气化进样技术,因此可能存在样品歧视效应。为了实现最佳的重现性,所有样品组分必须在相同的分流比下达到分离,而不考虑相对分子质量、组分浓度、极性、进样体积和进样口温度等差异。尽管可以采用各种结构的进样口系统使这种歧视效应最小化^[36],但是分流进样得到的定量结果,通常没有不分流进样和柱上进样得到的结果令人满意。

3.2 不分流进样

不分流进样是利用一种“溶剂效应”^[37],允许进样的稀释样品体积相对较大($1\sim 5\mu\text{L}$)。样品气化后进入色谱柱,重新富集后分析,实际上是为了避免谱带展宽。为了防止色谱柱过载,被分离组分的量应当小于 50ng 。样品制备中使用的过量溶剂在进样后 $30\sim 60\text{s}$ 内被逆流洗脱,从而使存在的溶剂峰尾尽可能小,避免掩盖较早流出的色谱峰。柱头处的样品重新富集存在两种机制。Grob和Grob^[38]利用“溶剂效应”,把溶剂作为样品组分的一道屏障,促进了柱头处的富集浓缩。这是因为当样品组分接触到与残留溶剂混合的液相时,样品区间前端的保留强于区间后端。为了尽可能减小由溶剂过载引起的色谱柱老化,

应当采用一种不易溶解液相的溶剂。二氯甲烷和正己烷已经得到广泛使用,同时应当注意初始柱温要比所用溶剂的沸点低 $10\sim 30^{\circ}\text{C}$ 。

另一种柱头处样品重新富集的方法是使柱温足够低,从而浓缩样品(冷收集)^[35]。沸点高于柱温 100°C 的化合物通常采用冷冻收集是使用这项柱前浓集技术的基本原则。因此,当组分浓度过低,采用分流进样无法检测($<0.1\%$ 样品量),或者样品量非常有限时,应当使用不分流进样。

3.3 柱上进样

对于热不稳定化合物,样品在气化过程中可能发生降解。Schomburg等^[39]设计了一种柱上进样技术,样品温度不会高于柱温。这种方法也可以广泛用于低挥发性化合物和沸点范围较宽的样品分离。柱上进样系统即使用一种固定于微量注射器上的细长熔融石英针,插入毛细管色谱柱的小孔内^[40]。这种细长针非常脆弱,无法用于常见的隔膜穿刺进样,因此人们发明了另一种方法,即不用隔膜的阀进样口^[41]。

后来人们采用进样口空气冷却技术,设计了改良的进样口系统,从而克服了慢速进样引起的针内气化现象,满足了所进样品窄谱带的需要^[42]。

3.4 自动进样

进样过程已经实现了自动化,这样更加有利于大量样品的批量测定,完全不需照看。适用于填充柱和毛细管柱的各种自动进样系统已经商品化,这些系统建立在注射器进样技术的使用和微处理器控制的气动操作的基础上。进样环广泛用于将气体引入色谱柱中。手动连续注射进样也普遍采用。在后面的例子中,操作者的进样手法能够显著影响分析的质量^[35]。一个技术熟练的操作者手动进样时,应小心去除注射器中的气泡,进样体积至少为注射器容积的 50% ,从而使针内残留和误差最小化,同时采用一种重现性非常好的进样技术,此时获得的精密度可以达到 $\pm 1\%$ 。然而,自动进样器的出现大大提高了进样精确度和准确度。此外,还可轻松进行注射器清洗的自动化,从而有效避免了手动进样可能带来的样品间的交叉污染。



4. 柱温箱和温度控制

色谱柱通常悬挂在一个隔热的空气温控箱内,通过风扇或泵,空气可以快速循环。柱温箱的温度控制非常精确,通常在 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 的范围内,以使热梯度最小化;同时也可以根据程序控温的需要,进行温度快速升高和快速冷却等操作。

填充柱的进样口温度采用恒温调节加热。为了避免进样过程中发生柱效损失,这部分的温度应当足够高,使样品快速气化。为了避免样品富集,不可避免地导致色谱峰展宽和组分峰丢失,检测器也使用加热系统,但加热系统与检测器类型有关。检测系统的温度控制应当稳定,这样通常可以降低噪声,提高检测限。使用FID时,检测器温度应当足够高,从而避免燃烧过程中生成水和其他副产物。

5. 检测器

人们已经设计了多种用于GC的检测器。除了大量出版物之外,一些讨论GC检测器设计和工作原理的书籍和综述也已经出版^[43~46]。

色谱检测器位于色谱柱出口处,连续监测流出气体,产生经放大的电信号,显示检测器响应-时间图,也就是色谱图。检测器可能属于“通用型”,对流出的各个组分均有响应(TCD),也可能属于“选择型”,只对具有某种官能团或者元素特征的被测物产生响应(ECD和FID),或者属于“专用型”,提供与流出组分结构相关的定性信息(FPD)。但是,仅仅从分类看,GC检测器通常分为两类:浓度依赖型(concentration-dependent)和质量速度依赖型(mass rate-dependent)。前者包括TCD和ECD,产生的信号与载气中样品浓度成比例;后者(如FID)的检测器信号取决于单位时间内流经检测器的样品质量数(g/s)。与检测器有关的一些最重要参数包括:①灵敏度,为被测组分的进样量函数;②信号噪声,指随机瞬间的检测器响应,与灵敏度共同决定了被测组分的检测限;③线性响应,即检测器信号与样品浓度或质量流速成正比的范围。检测器的动态线性范围是指检测信号与样品量呈线性关系的样品量范围。因此,宽线性范围可以用于多组分混合物的定量分析。与取决于电子因素、温度敏感度或者流速变化的瞬间噪声相比,长期噪声是由色谱中的基线漂移引起的。

USP^[21]指定的常用GC检测器包括FID、碱化FID(NPD、TD)、ECD和TCD。关于这些检测器的知识,包

括工作原理和相关性能,在原著的第一版中已经介绍^[23]。其他GC检测器包括光致电离检测器(PID)、火焰光度检测器(FPD)、电解电导检测器(ELCD)、氧化还原检测器(RCD)、硫化学发光检测器(SCD)和氦离子化检测器(HID)^[47]。表1对常用GC检测器的一些特征进行了概括。

除了上述检测器之外,一些更新、更加复杂的检测技术已经出现,它们将各种分光光度技术与GC相结合。这些联用技术包括质谱在线连接(GC-MS)^[57~60]、结合傅里叶转换技术的红外分光光度计(FTIR-GC)^[61]和FTIR-GC-MS^[62]。总的来说,这些都属于专用型检测器,主要用于获得定性信息,在选择性离子检测模式(SIM)下使用GC-MS系统也可以获得定量数据。与用于定性分析的正常扫描模式相比,这种模式可以监测被测物中的单个或少量特征离子,随后进行定量测定^[63,64]。三级、四极杆质谱仪正逐渐流行,与GC的联用也日益增多,这大大提高了定量分析能力^[60]。

6. 色谱柱

专用的色谱柱取决于各种因素,如固定相、固态担体、色谱柱管体材料、内径、流体负载百分比和温度等。色谱柱可以根据使用目的制备成各种长度和内径。当进样体积 $\geq 0.5\text{mL}$ 时,用于各组分定量收集的制备型色谱柱的直径可以从 $0.95\sim 10\text{cm}$ 不等($3/8'\sim 4'$)或者更大。分析型(或填充型)色谱柱的外径通常为 3mm 、 4.7mm 或 6.25mm ($1/8'$ 、 $3/16'$ 或者 $1/4'$),内径为 $1\sim 4\text{mm}$,而毛细管色谱柱的内径非常小,用于分辨率要求很高的场合。实际上,管体的内径是决定色谱柱分离性能的最重要的规格之一。

填充柱可以由各种材料制成,如玻璃、镍、不锈钢、铜、铝,甚至为特氟龙,但是除另有规定外,USP^[21]和BP^[22]推荐采用玻璃柱或者不锈钢柱进行药物分析。玻璃柱的优点在于与金属柱相比,具有相对良好的惰性,尽管易碎是其一大缺点。为了进一步提高玻璃的惰性,通常用 $5\%\sim 10\%$ (v/v)二甲基二氯硅烷的甲苯溶液对柱内壁进行硅烷化^[65]。

毛细管柱通常由熔融石英制成,制备时外部涂上聚酰胺使其具有弹性,降低断裂的可能性。根据色谱柱的内径,可以分为三大类。常用内径为 0.53mm 、 $0.32\sim 0.22\text{mm}$ 和 $0.2\sim 0.1\text{mm}$,分别对应于大孔径(宽孔径)、正常孔径(高分离度)和微孔径(高速)。

表1 各种检测器的特征

检测器	分类	响应	推荐载气	应用	检测限/g	注释
TCD	浓度	通用型	氢气或氦气	大多数化合物包括水	$10^{-6}\sim 10^{-8}$	尽管灵敏度低于其他检测器,但可用于水分测定 ^[48] 和测定某些对FID无响应的化合物;属于非破坏型检测器,可用于制备工作

续表

检测器	分类	响应	推荐载气	应用	检测限/g	注释
FID	质量流速	通用型	氩气、氦气或氮气	大多数化合物不包括水	$10^{-10} \sim 10^{-11}$	对水和二硫化碳无响应，它们对分析无干扰可作为溶剂
ECD	浓度	选择型	氢气、氦气或氩气/5%~10%甲烷	具有高度吸电子基团的化合物，如卤代物	$10^{-12} \sim 10^{-14}$	对于带负电荷的化合物非常出色，如含有高度共轭 π 电子系统、硝基和高度共轭芳香族等化合物，以及很容易衍生化后产生响应的化合物 ^[49] ；响应值也与载气流速有关
NPD	质量流速	选择型	氢气、氦气或氮气	含有氮或磷的化合物	$10^{-12} \sim 10^{-13}$	可以在火焰和无火焰两种模式下使用；在后者中，燃气（氢气）流速非常低，在钾盐或铷盐的加热珠周围形成等离子体，这样就降低了对烃类的响应，降低了干扰；在火焰模式下，卤代物和有机铅化合物对 NPD 也有响应；磷酸盐（来自于清洁剂）、氯化溶剂和硅烷化试剂能够消耗碱性珠，因此应当避免使用 ^[50]
PID	浓度	通用型	氦气或氮气	离子化电势小于 12eV 的化合物	2×10^{-12}	载气中必须不含氧和烃类，分别避免灵敏度降低和干扰；水、二氧化硫、小于己烷的饱和烃、氯仿、二氯甲烷、氯乙烯和乙腈不能检测；属于非破坏型，能够检测一些低含量的无机化合物 ^[51]
FPD	质量流速	选择型	氢气或氮气	含磷和含硫化合物	2×10^{-10}	使用火焰、光电倍增管以及分别对应于硫和磷检测的 393nm 和 526nm 滤光器 ^[52]
ELCD	浓度	选择型	氦气或氮气	含硫、含氮和卤素化合物	$10^{-12} \sim 10^{-13}$	色谱柱流出物经高温裂解后，去除了不需要的物质，降解物与某种液体（醇类/水）混合，随后测定差示传导率。对含氮、含硫或者卤素化合物的专属性，取决于使用的反应气以及反应过程是还原性的还是氧化性的 ^[53]
RCD	浓度	选择型	氦气	发生化学反应并放射光子的化合物	2×10^{-11}	与 ELCD 一样，作用于柱后流出物。RCD 对作为还原剂的化合物具有响应，如醇类、醛类、烯烃和羧酸类；对许多潜在的干扰化合物没有响应，如水、氧气、烃类和二氧化碳 ^[54]
SCD	浓度	专用型	氦气	含有碳硫键的化合物	$10^{-11} \sim 10^{-12}$	含硫化合物与氟反应生成 HF，测定随后产生的化学发光。饱和烃类、二氯甲烷、乙腈、甲醇和四氯化碳响应很小或者没有响应 ^[55]
HID	质量流速	通用型	氦气	气体和液体中的痕量杂质	$10^{-12} \sim 10^{-14}$	为了达到最佳灵敏度，载气氦气的纯度必须达到 99.9999%；可用于检测氮的氧化物、含硫气体、醇类、醛类、酮类、烃类和水 ^[56]

GC 中固定相的选择非常重要，因为这是关系到分离过程选择性的主要可变因素。固定相可以为非极性、极性或者中等极性的材料。最近，人们发现环糊精和由不同数量吡喃葡萄糖单位组成的环状低聚糖，对手性化合物的分离非常有效^[66]。通常使用三类衍生物，分别为 5-羟丙基（亲水性）、二烷基（疏水性）和三氟乙酰基（中等极性），每种固定相在一定范围内都具有选择性。

毛细管柱具有许多优点，如分析速度快，有高分离度和极高的总分离效率等。USP^[21] 新收录了一些毛细管柱的应用，特别是 OVI 的测定法，几乎全部规定采用毛细管柱，在其他 GC 方法中，大约 20% 采用毛细管柱。

固态担体应当具有化学惰性和非常大的表面积。使用的担体材料有硅藻土、特氟龙、玻璃珠和各种聚合物。由

于硅藻土材料的表面由硅羟基（Si—O—H）和硅烷基（Si—O—Si）组成，具有氢键的化合物（如醇类、酸类、胺类等）可与这种介质相互作用，导致拖尾现象产生。然而，通过酸洗去除无机杂质后进行硅烷化^[65]，能够使这个问题最小化。酸洗熔融煅烧硅藻土通常用于药物分析。

经特别处理的玻璃珠可以作为高相对分子质量化合物的担体材料。在涂布液相之前，玻璃珠通常经过侵蚀和硅烷化处理。特氟龙是分析短链极性化合物的一种非常有效的担体材料，这些化合物在硅藻土担体上会产生拖尾现象，另外，需要特别指出的是，这种担体材料还可用于腐蚀性物质的分析，如卤化酸。

当分离仅受吸附机制影响时（GSC），可以使用各种吸附剂和多孔聚合物。已经商品化的吸附剂包括硅胶、活性

炭和分子筛等。这些吸附剂主要用于气体和低相对分子质量低沸点化合物的分析^[67]。

多孔聚合物也可用于气体和高极性分子的分析，如胺类、乙二醇和酸类。已经商品化的有苯乙烯-二乙烯苯共聚物和其他材料，如乙基乙烯苯-二乙烯苯、交联丙烯酸酯、乙烯吡啶、吡咯酮和乙烯基乙二醇二异丁烯酯等^[29]。

空心柱是简单的毛细管，柱内壁作为液相的担体。这种壁涂空心柱（WCOT）的固定相在管体内表面以薄膜形式分布，内壁充当担体的角色。为了降低液相膜的厚度，可以在管体内壁涂上一层多孔层，再用液相涂布，这样就得到了一种载体涂渍空心柱（SCOT）。多孔层空心柱（PLOT）与 SCOT 柱相似，区别在于前者固定相处于具有良好结晶性的微粒或玻璃粉末中，而微粒粉末吸附在管壁上。在这两种柱中，内壁的有效表面积增加，在相同长度和直径的管体内所能容纳的液相量也同样增加。须状壁（whisker wall, WW）色谱柱由壁表面上经化学侵蚀形成的须状物组成，这样使有效表面积大大增加。壁涂、多孔层和载体涂渍空心柱都可以采用须状壁，即分别为 WWOT、WWPLOT 和 WWSCOT。

毛细管柱的固定相膜厚从 0.1~10 μm 不等，可以分为三个膜厚范围。薄膜柱通常为 0.1~0.2 μm，具有良好的稳定性。与膜更厚的色谱柱相比，其所能负载的样品量更少，但是在高温下使用最佳。厚膜柱通常为 0.6~10 μm，允许的样品负载量更高，对挥发性化合物的保留更强，同时具有很强的惰性。然而，其主要缺点是与薄膜柱相比，高温下的柱流失更多。中等膜厚柱的膜厚大约为 0.3~0.6 μm，在样品负载量、保留能力和相稳定性方面可以作为一种折中的选择。

除了空心毛细管柱之外，商品化的还有填充型毛细管柱，甚至微填充毛细管柱。这些柱含有担体材料，内径范围为 0.6~1.0 mm，主要优点是可以负载较多的样品量。由于是不同于分流分析的直接分析，可以使用柱效相对很高的短柱，因此这些填充型毛细管柱非常有效。

常用的柱长为 0.3~6.1 m（1~20 ft），外形可以为直形、U 形、螺旋形或者平环形。据说直形柱和 U 形柱的柱效略高于环形柱的柱效。然而，GC 柱温箱的尺寸通常限制了形状的选择。毛细管柱通常比填充柱长很多，空心柱的长度为 10~100 m，而填充型毛细管柱则为 1~6 m。

分离技术

气相色谱分析可以在恒温条件下进行（等温模式），也可以在柱温随时间升高的条件下进行（程序升温）。

1. 等温模式

在等温 GC 中，峰宽随保留时间线性增加^[68]，而保留时间则随同系物中碳原子数量呈指数增加。相反，在程序升温气相色谱（PTGC）中，峰宽保持恒定，保留时间仅随同系物中碳原子数量线性增加^[69]。

用于药物制剂和原料中杂质检查的气相色谱法通常采

用等温模式，仪器的温度在整个分析过程中保持恒定。然而，分析含有沸程差异较大组分的复杂混合物时，无疑应选择 PTGC。如果采用等温模式，分离这种混合物中各组分可能非常困难。若分析温度很高，快速流出的挥发性组分间的分离度可能较差。另外，若分析温度很低，低挥发性组分的保留时间会很长，得到的色谱峰很宽，从而导致检测灵敏度变差，运行时间变长。

2. 程序升温

PTGC 产生于 1952 年^[70]，随后出现了可进行程序升温的商品化仪器，为分析含有沸点差异很大组分的复杂混合物提供了必要的方法，同时解决了采用前述等温分离时可能产生的一些问题。

PTGC 技术指在流出过程中以设定的速率升高柱温。升温速率可以在整个运行过程中保持恒定，也可以在温度升高过程之间的某些时间段内自动程控一些等温步骤。电控柱温箱设计的升温速率通常为 0.5~30 °C/min。选择的初始温度应当使保留最弱组分的保留时间尽可能小，而最终温度应当使挥发性最低组分在合适的时间内流出。在准备分析下一个样品时，仪器自动将柱温设置为初始温度。

然而，PTGC 的主要问题在于温度升高时柱流失可能会使基线发生漂移，从而对分析产生干扰。通常采用一个双色谱柱/双检测器系统，或者用另一种低挥发性涂层材料代替液态固定相，来补偿这种效应。在前一种情况下，参比柱的输出信号用来抵偿分析柱的柱流失。当以电子程序控制载气流速时，也可以采用单色谱柱/单检测器系统进行电子补偿；在后一种情况下，分析过程中载气流速不断增加，这样就避免或者减少柱流失，从而降低基线漂移。由于可以使用较低柱温，热不稳定化合物的分析更加容易，宽范围的液相也可以使用。

3. 特殊技术

由于某些因素，如非挥发性、不稳定性、低检测响应或者高吸附性（存在极性基团时）等多种化合物不易采用 GC 法进行分析。这些问题有时可以通过裂解作用或者衍生化加以解决。前一种技术使高相对分子质量、非极性物质经高温分解生成更轻、挥发性更强的化合物。

衍生化是 GC 法的一种有效辅助方法。采用有机合成反应，如酯化、酰化和硅烷化等，可以生成合适的衍生物^[29]。这些方法可以提高不稳定化合物的热稳定性；某些情况下可提高检测能力（如用于电子捕获检测的衍生物）和灵敏度；在化合物母体无挥发性的情况下提高挥发性；还能够屏蔽极性基团以减少吸附。一些详细讨论衍生化的报告和综述最近几年已经发表^[71~74]。

4. 定量和定性分析

GC 分析技术就是指同时进行混合物中的组分分离和定量定性测定。

组分流出峰的峰面积与该组分的浓度成比例。在假设

S

峰形符合高斯模型的前提下,可以采用多种方法测量流出峰的峰面积。电子积分是首选方法,因为这种方法的准确度和精确度非常高($RSD \leq 0.5\%$)。

峰高也可以采用,但是可靠性较差,因为温度或者流速的任何变化都会影响测量结果。峰面积也可以通过峰高和半峰宽的乘积进行计算,得到的结果相当于实际峰面积的84%^[75]。三角测量法、测面法和剪裁称重法等也可以用于测量峰面积。

为了使由进样体积带人的可能误差最小化,应当采用内标(IS)法。这种方法中加入了一种样品中本身不存在的化合物,也就是内标物。内标物通常在被测组分附近出峰,在一定的色谱条件下应当与被测组分达到良好分离,并且能够轻易被检测。内标物以恒定量加入到不同浓度的待测标准物质溶液中。将两个色谱峰(被测物/内标物)峰面积或峰高的比值对被测物浓度或量作图,绘制校正曲线。这样每个样品的浓度或量就可以通过校正曲线插值法获得。校正曲线应当为一直线,且截距为零。然而,当被测物浓度过高,超过了所用检测器的线性范围时,可能会得到一条非线性标准曲线。高背景或干扰物质的存在会使标准曲线的截距为正值,而负截距通常表明在操作过程中发生了样品损失。

与内标法相反,可以使用外标法,制备几个浓度不同的样品标准溶液,每个标准溶液的进样体积一致,以峰面积(或峰高)对浓度作图,未知样品的浓度可以通过校正曲线插值法获得。然而,这种方法是否可行,取决于进样精确度,通过自动进样方式可以轻松完成,但采用微量进样器人工进样时较难达到要求。

另一种定量法为归一化法,有时可用于测定混合物中一个或多个组分的比例,即计算色谱图中单个组分峰面积与所有组分峰面积之和的比值。这种方法假定所有组分对检测器具有相同的响应因子。当混合物中所有组分的化学结构相似时,这种假设是合理的。当分析组分化学结构不同时,应当使用响应因子进行校正,即测量一个已知量纯物质的峰面积,根据下式计算各自的响应因子(F):

$$F = \frac{\text{组分量}}{\text{峰面积}} \quad (8)$$

使用专用型检测器,如GC-MS、FTIR-GC和FTIR-GC-MS,或者根据相对保留时间,或者通过保留指数这一概念(参见下文),可以得到定性数据。

5. 顶空分析

药物的质量标准中,除了测定自身活性成分外,还包括中间体、残留溶剂和其他与制剂相关的挥发性杂质^[21]的信息和限度检查。

顶空分析是一种分析挥发性化合物非常有效的技术,在样品中存在腐蚀性或难挥发性组分时直接进样会损坏色谱柱的情况下特别有用。顶空分析可以避免大量繁琐的样品制备过程,消除可能存在的干扰组分,同时还可避免不稳定组分在进样口或色谱柱内发生降解^[76]。

液态或固态样品置于小瓶中,用一种隔膜密封后,在预先设定的温度下加热一段时间,接着样品和蒸气相之间到达平衡,气态相中的一部分挥发物随后注入色谱柱。可以采用几种不同方法将顶部挥发物转移至GC中,从使用一种气体注射器人工取样,到复杂的自动进样,通过转运线路和阀将蒸气直接导入色谱柱中。

可以使用两种主要技术,即静态和动态进样。在静态进样法中,顶空瓶温度保持足够长的时间,使气态相和样品相之间达到平衡。动态进样法中使用一种惰性气体,吹过或通过恒温样品足够长的时间,从而提取出大部分或所有的挥发性组分。USP^[21]中记载了关于OVI的各论,其中提到了5种OVI(氯仿、二氯甲烷、苯、三氯乙烯和二氧六环)。以前,USP记载的方法2和方法3,可以在直接进样和动态顶空进样之间进行选择。然而,现在这两种方法已经被取消,方法4提供的静态顶空进样^[77]作为通用方法。方法6仍被收录,采用直接进样,但是USP或NF中均没有收录使用方法6进行OVI检查的各论。现在的趋势是在各论中用方法4替代其他方法,这些各论以前规定采用方法6^[78]。Hinshaw对顶空进样技术的优点和产生的问题进行了讨论^[79]。

药理学应用

GC法在药物分析中的应用在某些书籍、药典和Jack撰写的综述^[80]中均有介绍,读者可以查阅。除此之外,读者还可以参考三部系列丛书^[81],其中包括HPLC测定法,以及由Adamovics^[82]编辑的书籍,书中详细列出了各种已报道的色谱法。

对于药物含量测定法的选择,药典收录的色谱方法中HPLC法已经很大程度上取代了GC法,但是监测某种杂质,以及测定多数药物制剂和原料中的各种有关物质和OVI时,GC法仍然是一种重要而有效的分析方法。此外,为了监测治疗药物,进行药物动力学研究以及评价生物利用度/生物等效性时,GC法仍然是分析生物体液中药物的一种有力工具。

然而,多数药物可以采用GC法分析,也可以采用HPLC法分析。从使用成本和可获得已有设备方面考虑,GC法通常是第一选择,它的优势在于可以避免使用昂贵的溶剂,以及随后产生的废液处理问题。

1. 原料药和制剂

USP/NF^[21]和BP^[22]均采用GC法进行如下测定:①含量测定;②色谱纯度;③鉴别;④挥发性物质、中间体和有关物质;⑤水分;⑥异构体、异构体纯度以及外消旋体比例;⑦乙醇量。

表2~表11列出了各种化合物和相关的USP试验项目,以及相应的色谱条件。药物和相应制剂按字母顺序排列,而各种GC担体和液态(涂渍)相的描述与USP中使用的缩写对应。

表 2 药典将 GC 用于测定药物原料和制剂的品种

材料/剂型	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
丙酮	1.8m×3mm I. D. S4	氮气	110~220 8℃/min	FID	无	NF (19, p. 2409)
乙酰三丁基枸橼酸酯	30m×0.32mm I. D. Column Bonded with G42(0.5mm)	氮气	80~220 20℃/min	FID	无	NF (19, p. 2409)
盐酸金刚烷胺胶囊 盐酸金刚烷胺糖浆	Glass, 1.22m×2mm I. D. 10%G1/S1A (100~120mesh)	未指定	115	FID	萘	USP (24, p. 103, 104)
蕈取阿米曲士浓缩剂	1.5m×4mm I. D. 3%G1/S1A	氮气	250	FID	角鲨烷	USP (24, p. 121)
水合戊烯	Glass, 2m×4mm I. D. S2	氮气	190	TCD	无	NF (19, p. 2414)
硫酸阿托品眼膏 硫酸阿托品滴眼液 硫酸阿托品片	Glass, 1.8m×2mm I. D. 3%G3/S1AB	氮气	225	FID	氢溴酸后马 托品	USP (24, p. 179)
阿伏苯宗	Fused Silica 25m×0.32mm Capillary coated with G1	氮气	200~280 4℃/min	FID	无	USP (24, p. 181)
颠茄浸膏 颠茄浸膏片 颠茄叶 颠茄酊 苯佐卡因和薄荷醇外用气 雾剂	Glass, 1.2m×4mm I. D. 3%G3/S1AB 1.8m×2mm I. D. 10%G16/S1AB(for Menthol)	氮气 氮气	215 170	FID FID	后马托品 癸醇	USP (24, p. 199, 200,201) USP (24, p. 208)
苯甲醇	Glass or Stainless Steel, 1.8m×3mm I. D. 5%G16/S1	氮气 或 氮气	140	FID	苯酚	USP (24, p. 1865)
仲丁比妥	1.8m×4mm I. D. 10%G37/S1AB		260	FID	二十四烷	USP (24, p. 261)
仲丁比妥钠酞剂 仲丁比妥钠片	Glass, 0.9m×4mm I. D. 3%G10/S1A (80~100mesh)	氮气	200	FID	司可巴比妥	USP (24, p. 262)
丁烷	Aluminum, 6m×3mm I. D. 10%liquid G 30/S1C	氮气	33	TCD	无	NF (19, p. 2422)
丁羟基茴香醚	Stainless Steel, 1.8m×2mm I. D. 10% liquid G26/S1A	氮气	175~185	FID	4-叔丁基 苯酚	NF (19, p. 2422)
蓖麻油乳剂	Glass, 1.8m×4mm I. D. G25/S1	氮气	245	FID	邻苯二酸 二-(2-乙基 己基)酯	USP (24, p. 323)
十八醇	2m×3mm I. D. 10%liquid G2/S1A	氮气	205	FID	无	NF (19, p. 2434)
十六醇	2m×3mm I. D. 10%liquid G2/S1A	氮气	205	FID	无	NF (19, p. 2435)
三氯叔丁醇	Glass or Stainless Steel, 1.2m×3mm I. D. 5%G16/S1A	氮气 或 氮气	110	FID	苯甲醛	USP (24, p. 1865)
氯二甲酚	Glass, 1.8m×4mm I. D. 3%G16/S1A	氮气	210	FID	无	USP (24, p. 391)

续表

材料/剂型	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
盐酸林可霉素棕榈酸酯 盐酸林可霉素棕榈酸酯口服液	Glass, 0.6m × 3mm I.D. 1% G36/ S1AB(80~100mesh)	氮气	290	FID	苯甲酸胆甾醇酯	USP (24, p. 431, 432)
氯碘羟喹 氯碘羟喹乳膏 氯碘羟喹软膏 氯碘羟喹和氢化可的松乳膏 氯碘羟喹和氢化可的松软膏	Glass, 1.83m × 2mm I.D. 3% G3/S1AB (80~100mesh)	氮气	165	FID	苾	USP (24, p. 435, 436)
环甲基硅油	3.66m × 3mm I.D. 20% liquid G1/S1A (60~80mesh)	氮气	125~320 8℃/min	TCD	无	NF (19, p. 2443)
地氟烷	Stainless Steel, 3.7m × 2.4mm I.D. 10%G31 and 15%G18/S1A	氮气	80~88 2℃/min 88~175 70℃/min	FID	氟烷	USP (24, p. 504)
癸二酸二丁酯	1.8m × 2mm I.D. 10% liquid G41/S1A (100~120mesh)	氮气	150~280 4℃/min	FID	无	NF (19, p. 2445)
二氯二氟甲烷 二氯四氟乙烷	Stainless Steel, 1.8m × 2mm I.D. 1% G25/S12	氮气	70~170 10℃/min	FID	无	NF (19, p. 2445, 2446)
盐酸双环维林胶囊 盐酸双环维林注射剂 盐酸双环维林糖浆 盐酸双环维林片	Fused Silica 15m × 0.5mm coated with G3(1mm)	氮气	160~240 20℃/min	FID	非那西丁	USP (24, p. 549, 550, 551)
二甲基甘油单乙基醚	30m × 0.32mm I.D. fused Silica column with G46(1mm)	氮气	120~225 12℃/min	FID	无	NF (19, p. 2447)
二甲亚砜凝胶	1.8m × 4mm I.D. 15% G39/S1A	氮气	160	FID	二甲基甲酰胺	USP (24, p. 580)
二甲亚砜灌洗剂	Glass, 1.5m × 3mm I.D. 10% liquid phase G25 on packing S1A	氮气	100~170 10℃/min	FID	二苯基	USP (24, p. 581)
二甲亚砜外用溶液	1.8m × 4mm I.D. 10% liquid phase G16 on packing S1A	氮气	170	FID	二甲基甲酰胺	USP (24, p. 581)
盐酸地芬诺酯和硫酸阿托品口服溶液	Glass, 1.2m × 4mm I.D. 3% G3/S1 (for Atropine Sulfate)	氮气	230	FID	氢溴酸后马托品	USP (24, p. 585)
恩氟烷	Stainless Steel, 3m × 4mm I.D. 20% G4/S1A(60~80mesh)	氮气	60~125 6℃/min	TCD	无	USP (24, p. 642)
混合雌激素 混合雌激素片 酯化雌激素 酯化雌激素片	15m × 0.25mm I.D. fused Silica capil- lary bonded with G19(0.25mm)	氢气	220	FID	3-O-甲基雌酮	USP (24, p. 681, 682, 683, 684)
乙氯维诺	Glass (pre-treated with 10% dimethyldi- chlorosilane in toluene), 1.8m × 4mm I.D. 10% G16/S1AB(60~80mesh)	氮气	160	TCD	无	USP

续表

材料/剂型	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
乙氯维诺胶囊	Glass(pre-treated with 10% dimethyldi chlorosilane in toluene), 1.8m×4mm I.D. 10%G16/SIAB(60~80mesh)	氮气	160	FID	三氯叔丁醇	USP 24, p. 691
桉叶素	60m×0.32mm I.D. Fused Silica capillary G16	氮气	60~200 6℃/min	FID	无	USP (24, p. 705)
愈创甘油醚和磷酸可待因糖浆	0.6m×2mm I.D. 3% liquid G3/SIA (100~120mesh) (for Codeine Phosphate)	氮气	210	FID	重酒石酸二氢可待因酮	USP (24, p. 793)
愈创甘油醚和磷酸可待因糖浆	1.2m×4mm I.D. 3% liquid G6/SIA (100~120mesh) (for Guaifenesin)	氮气	170	FID	邻苯二甲酸二丙酯	USP (24, p. 793)
胡莫柳酯	30m×0.53mm I.D. G27(1mm)	氢气	70~220 6℃/min	FID	无	USP (24, p. 816)
羟丙基甲基纤维素	Glass, 1.8m×4mm I.D. 20%G28/SIC (100~120mesh)	氮气	130	TCD	甲苯	USP (24, p. 843)
莨菪碱片	Glass, 1.8m×2mm I.D. 3% liquid G3/SIAB	氮气	225	FID	氢溴酸后马托品	USP (24, p. 850)
硫酸莨菪碱酞剂 硫酸莨菪碱注射剂 硫酸莨菪碱口服液 硫酸莨菪碱片	Glass, 1.8m×2mm I.D. 3% liquid G3/SIAB	氮气	225	FID	氢溴酸盐	USP (24, p. 851, 852, 853)
异丁烷	Aluminum, 6m×3mm I.D. 10% liquid G30 on nonacid washed SIC	氮气	33	TCD	无	NF (19, p. 2467)
异戊基甲氧基肉桂酸酯	25m×0.32mm I.D. coated G1 (0.1mm)	氮气	60~240 8℃/min	FID	无	USP (24, p. 918)
异氟烷	Nickel or Stainless Steel, 3.7m×2.4mm I.D. 10% G31 1 15% G18 on SIC(60~80mesh)	氮气	65~110 4℃/min	FID	乙酸丁酯	USP (24, p. 920)
异氟磷滴眼液	Glass, 1.8m×4mm I.D. 5% G33/SIAB(80~100mesh)	氮气	75~80	FID	环己酮	USP (24, p. 921, 922)
异丙醇	Stainless Steel, 1.8m×6.4mm I.D. 10% liquid G20/SIA	氮气	55	TCD	无	USP(24, p. 927) NF(19, p. 2468)
异丙基豆蔻酸酯	1.8m×4mm I.D. 10% liquid G8/SI (100~120mesh)	氮气	90~210 2℃/min	FID	无	NF (19, p. 2468)
棕榈酸异丙酯	1.8m×4mm I.D. 10% liquid G8/SI (100~120mesh)	氮气	90~210 2℃/min	FID	无	NF (19, p. 2468)
异山梨醇 异山梨醇口服液	Glass, 0.6m×3mm I.D. S9	氮气	230	FID	三甘醇	USP(24, p. 934, 935)
林旦乳膏 林旦洗液 林旦洗发剂	Glass, 1.8m×3mm I.D. G3/SIA	氮气	195	FID	n-二十二烷	USP (24, p. 976, 977)

S

续表

材料/剂型	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
马拉硫磷洗剂	Glass, 1.8m×2mm I. D. 5% liquid G6/S1A(110~120mesh)	氮气	190	FID	硝苯硫磷酯	USP (24, p. 1012)
薄荷脑锭剂	30m×0.53mm I. D. fused Silica coated with G16(mm)	氮气	125	FID	茴香脑乙烷液	USP (24, p. 1038)
邻氨基苯甲酸甲酯	25m×0.32mm I. D. Column coated with G1(0.1mm)	氮气	60~240 8℃/min	FID	无	USP (24, p. 1039)
盐酸美沙酮注射液	Glass, 1.2m×4mm I. D. 3% G2/S1A(10~20mesh)	氮气	170	FID	普鲁卡因	USP (24, p. 1057)
美索比妥钠注射液	1.2m×4mm I. D. 3% G10/S1AB	氮气	230	FID	阿普比妥	USP (24, p. 1069)
甲氧氟烷	Stainless Steel, 3m×4mm I. D. G11/S1A	氮气	100~110	TCD	无	USP (24, p. 1074)
甲醇	Stainless Steel, 2m×3mm O. D. S4(50~80mesh)	氮气	140	FID	无	NF (19, p. 2479)
甲基苯亚甲基樟脑	30m×0.32mm I. D. fused Silica capillary coated with G1(0.25mm)	氮气	100~230 10℃/min	FID	无	USP (24, p. 1077)
甲基纤维素	1.8m×4mm I. D. 10% liquid G1/S1A(100~120mesh)	氮气	100	FID	甲苯	USP (24, p. 1079)
二氯甲烷, 氯化亚甲	1.8m×4mm I. D. 15% liquid G18/Unsilanized S1C(30~60mesh)	氮气	60	TCD	无	NF (19, p. 2480)
羟苯甲酯, 羟苯乙酯, 羟苯丙酯, 羟苯丁酯	Glass or Stainless Steel, 1.8m×2mm I. D. 5% G2/S1A	氮气 或 氮气	150	FID	苯并苯巴比妥	USP (24, p. 1865)
米勃酮口服液	0.61m×3mm I. D. 1% liquid G6/S1AB	氮气	175	FID	1,3,5-三苯基苯	USP (24, p. 1112)
硝酸咪康唑软膏 硝酸咪康唑外用粉末 硝酸咪康唑阴道栓	1.2m×2mm I. D. 3% G32/S1A	氮气	250	FID	胆甾烷	USP (24, p. 1114, 1115)
氮 97%	3m×4mm I. D. synthetic Alkali metal Aluminosilicate as a molecular sieve	氮气	Controlled	TCD	无	NF (19, p. 2485)
氰双苯丙烯酸辛酯	60m×0.32mm I. D. column coated with G1(0.25mm)	氮气	80~280 4℃/min	FID	无	USP (24, p. 1213)
辛基十二烷醇	2m×2mm I. D. 3% G2/S1A	氮气	80~300 6℃/min	FID	无	NF (19, p. 2286)
辛基甲氧基肉桂酸酯	25m×0.32mm I. D. column with G1	氮气	None	FID	苯甲酸苄酯	USP (24, p. 1213)
水杨酸辛酯	25m×0.32mm I. D. column coated with G1(0.1mm)	氮气	60~240 8℃/min	FID	无	USP (24, p. 1214)
氧雄龙片	Glass, 2m×4mm I. D. 3% Methyl Silicone oil on 80-to 10-mesh acid-, base- and water-washed, flux calcined, silanized sliceaceous earth	氮气	250	FID	n-二十八烷	USP (24, p. 1225)

续表

材料/剂型	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
普鲁卡因青霉素 G, 硫酸双氢链霉素, 马来酸氯苯那敏和地塞米松混悬注射液(测定氯苯那敏)	Glass, 1.8m × 4mm I. D. 1.2% G16 amd 0.5%KOH/S1A(10~120mesh)	氮气	180	FID	马来酸溴苯那敏	USP (24, p. 1281)
戊巴比妥酞剂	Glass, 0.9m × 4mm I. D. 3% liquid G10/S1A(80~10mesh)	氮气	190~210	FID	n-二十三烷	USP (24, p. 1293)
戊巴比妥钠胶囊	Glass, 0.9m × 4mm I. D. 3% liquid G10/S1A(80~10mesh)	氮气	190~210	FID	n-二十三烷	USP (24, p. 1295)
全氟溴烷	60m × 0.25mm I. D. G2(1mm)	氢气	35~185 20℃/min	FID	无	USP (24, p. 1295)
酒石酸苯甲曲秦胶囊 酒石酸苯甲曲秦片	Glass, 1m × 1mm I. D. 3%G3/S1A	氮气	160	FID	苯佐卡因	USP (p. 1055)
扑痛酮口服混悬液 扑米酮片	Glass, 1.2m × 4mm I. D. 10% liquid G3/S1AB	氮气	260	FID	雄酮	USP (24, p. 1392, 1393)
丙烷	Aluminum, 6m × 3mm I. D. 10% liquid G30 on non-acid washed SIC	氮气	33	TCD	无	NF (19, p. 2505)
盐酸右丙氧芬, 阿司匹林和咖啡因胶囊(测定右丙氧芬和咖啡因)	0.6m × 3mm I. D. 3%Methyl Phenyl Silicone liquid/80~10mesh siliceous earth	氮气	175	FID	n-二十三烷	USP (24, p. 1423)
萘磺酸右丙氧芬口服混悬液 萘磺酸右丙氧芬片	Glass or Stainless Steel, 0.6m × 3mm I. D. 3%G2/S1AB	氮气	160	FID	n-二十三烷	USP (24, p. 1425)
萘磺酸右丙氧芬和阿司匹林片(测定右丙氧芬)	1.2m × 3mm I. D. 3%G3/ S1A	氮气	175	FID	n-二十三烷	USP (24, p. 1427)
丙二醇	Glass or Stainless Steel, 1m × 4mm I. D. 5%G16/S5	氮气	122~200 5℃/min	TCD	无	USP (24, p. 1434)
氢溴酸东莨菪碱注射液 氢溴酸东莨菪碱滴眼液 氢溴酸东莨菪碱眼膏 氢溴酸东莨菪碱片	Glass, 1.8m × 2mm I. D. 3% liquid G3/S1AB	氮气	225	FID	氢溴酸后马托品	USP (24, p. 1507, 1508, 1509)
司可巴比妥酞剂 司可巴比妥钠胶囊	Glass, 0.9m × 4mm I. D. 3%G10/S1A (80~100mesh)	氮气	200	FID	仲丁比妥	USP (24, p. 1509, 1510)
司可巴比妥钠和异戊巴比妥钠胶囊	Glass, 0.6m × 3.5mm I. D. 3% liquid G10/S1AB(100~120mesh)	氮气	175	FID	阿普比妥	USP (24, p. 1511)
盐酸大观霉素	Glass, 0.6m × 3mm I. D. 5% G27/ S1AB(80~100mesh)	氮气	190	FID	三苯锑	USP (24, p. 1545)
大观霉素混悬注射液	Glass, 0.6m × 3mm I. D. 5% G27/ S1AB(80~100mesh)	氮气	190	FID	六甲基二硅氮烷	USP (24, p. 1545)
硬脂酸	Glass, 1.5m × 3mm I. D. 15%G4/S1A	氮气	165	FID	无	NF (19, p. 2525)

S

续表

材料/剂型	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
纯化硬脂酸						
硬脂醇	2m×3mm I. D. 10%G2/S1A	氮气	205	FID	无	NF (19, p. 2526)
水合萜二醇 水合萜二醇酞剂	Glass, 1.2m×3.5mm I. D. 6%G1/S1A	氮气	120	FID	联苯	USP (24, p. 1607)
水合萜二醇可待因酞剂	Glass, 1.2m×3.5mm I. D. 6%G1/S1A	氮气	230	FID	联苯和 <i>n</i> - 苯唑啉	USP (24, p. 1608)
环戊丙酸睾酮 环戊丙酸睾酮注射液	Glass, 1.2m×3mm I. D. 1%G6/S1AB	氮气	260	FID	胆固醇辛 酸酯	USP (24, p. 1610 和 1611)
丁卡因和薄荷脑软膏	Glass, 1.8m × 2mm I. D. 10% G16/S1AB	氮气	170	FID	癸醇	USP (24, p. 1615)
替来他明和唑拉西洋注射液	1.24m × 4mm I. D. 3% G2/S1AB (100~120mesh)	氮气	150~230 10℃/min	FID	四苯乙烯	USP (24, p. 1660)
维生素 E 赋形剂	Glass, 2m×4mm I. D. 2%~5%liquid G2/S1AB(80~1000mesh)	氮气	245~265	FID	棕榈酸十六 烷酯	NF (19, p. 2531)
枸橼酸三丁酯	30m×0.32mm I. D. G42(0.5mm)	氮气	80~225 20℃/min	FID	无	NF (19, p. 2532)
三氯氟甲烷	Stainless Steel, 1.8m×2mm I. D. 1% G25/S12	氮气	70~170 10℃/min	FID	无	NF (19, p. 2532)
复方十一烯酸软膏	Glass, 1.8m×2mm I. D. 3%G1/S1A (100~20mesh)	氮气	165	FID	十三烷酸	USP (24, p. 1729)
丙戊酸	1.8m × 2.0mm I. D. 10% G34/S1A (80~100mesh)	氮气	155	FID	壬酸	USP (24, p. 1732)
丙戊酸胶囊 丙戊酸糖浆	Glass, 1.8m×2mm I. D. 10%G34/S1A (80~100mesh)	氮气	150	FID	联苯	USP (24, p. 1733, 1734)
维生素 E 维生素 E 制剂 维生素 E 胶囊	Borosilicate glass, 2m × 4mm I. D. 2%~5% liquid G2/S1AB (80 ~ 10mesh)	氮气	245~265	FID	棕榈酸十六 烷酯	USP (24, p. 1747)
维生素 E 聚乙二醇丁二 酸酯	5m×0.25mm I. D. fused Silica capillary with G27(0.25mm)	氮气	260~340 20℃/min	FID	花生酸乙酯	NF (19, p. 2535)
木糖醇	30m×0.25mm I. D. capillary with G46 (0.25mm)	氮气	170~215 6℃/min 215~270 10℃/min	FID	赤藓糖醇	NF (19, p. 2538)

表3 药典将 GC 用于测定色谱纯度和放射化学纯度的药物原料和制剂品种

材料/剂型	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
阿普唑仑	Glass, 1.2m×3mm I.D. 3%G6/S1AB	氮气	240	FID	无	USP (24, p. 64)
盐酸金刚烷胺	Glass, 1.8m×2mm I.D. G44/S1A (100~120mesh)	未指定	100~200 6℃/min	FID	无	USP (24, p. 103)
阿伏苯宗	Fused Silica 25m×0.32mm Capillary Coated with G1	氮气	200~280 4℃/min	FID	无	USP (24, p. 181)
氯二甲酚	Glass, 1.8m×4mm I.D. 3%G16/S1A	氮气	180	FID	无	USP (24, p. 391)
氯贝丁酯	15m×0.53mm I.D. Capillary Coated with G1(1.5mm)	氮气	120~180 5℃/min	FID	无	USP (24, p. 442)
二氯二氟甲烷	Stainless Steel, 1.8m×2mm I.D. 1% G25/S12	氮气	70~170 10℃/min	FID	无	NF (19, p. 2445, 2446)
双氯非那胺						
乙氯维诺	Glass(pre-treated with 10%dimethyldi- chlorosilane in toluene), 1.8m×4mm I.D. 10%G16/S1AB(60~80mesh)	氮气	160	TCD	无	USP (24, p. 691)
乙酸乙酯	Glass, 1.8m×4mm I.D. S11	氮气	115~200 16℃/min	FID	无	NF (19, p. 2450)
甘油	30m×0.53mm I.D. Fused Silica G43 (3mm)with a 5m×0.53mm I.D. Silica Guard Column(deactivated with phenyl- methyl siloxane)	氮气	40 ~ 220 5℃/min	FID	无	USP (24, p. 780)
氟烷	Stainless Steel, 3m×2mm I.D. 20% G24/S1AB	氮气	60	FID	1, 1, 2-三 氯-1, 2, 2- 三氟乙烷	USP (24, p. 806)
薄荷脑	1.8m×2mm I.D. 10%G16/S1AB	氮气	170	FID	癸醇	USP (24, p. 1038) 和 NF(19, p. 2477)
盐酸哌替啶	Glass, 2m×2mm I.D. 10%G3/S1A	氮气	190	FID	无	USP (24, p. 1039)
盐酸甲哌卡因	Glass, 1.8m×4mm I.D. 3%G19/S1A	氮气	230	FID	无	USP (24, p. 1041)
尼古丁	0.3m×0.53mm I.D. fused Silica col- umn bonded with G1(1.5mm)	氮气	50~250 5℃/min	FID	无	USP (24, p. 1179)
甲氧肉桂酸辛酯	25m×0.32 m I.D. Column with G1	氮气	80~300 线性地	FID	无	USP (24, p. 1213)
水 O15 注射液(放射化学 纯)	Stainless Steel, 1.8m×3mm I.D. S3 (80~100mesh)	氮气	150	TC,放 射性	无	USP (24, p. 1240)

续表

材料/剂型	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
二甲氨基苯酸辛酯	Stainless Steel, 1.8m×3mm I.D. 10% liquid G9/S1A	氮气	150~250 10℃/min	FID	无	USP (24, p. 1252)
全氟溴烷	60m×0.25mm I.D. G2(1mm)	氢气	35~18 20℃/min	FID	无	USP (24, p. 1295)
角鲨烷	1.8m×3mm I.D. 3%G1/S1A	氮气	130~270 6℃/min	FID	无	NF (19, p. 2524)
三唑仑	Glass, 1.2m×3mm I.D. 3%G6/S1AB	氮气	240	FID	无	USP (24, p. 1695)
三氯氟甲烷	Stainless Steel, 1.8m×2mm I.D. 1% G25/S12	氮气	70~170 10℃/min	FID	无	NF (19, p. 2532)
三氯生	15m×0.53mm I.D. capillary with G3	氮气	34	FID	无	USP (24, p. 1700)
丙戊酸	60m×0.32mm I.D. coated with G25	氮气	145	FID	无	USP (24, p. 1732)

表4 药典将GC用于药物原料和制剂的鉴别

材料/剂型	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
乙酰三丁基枸橼酸酯 乙酰三乙基枸橼酸酯	30m × 0.32mm I.D. column bonded with G42(0.5mm)	氮气	80~220 20℃/min	FID	无	NF (19, p. 2409)
阿米曲士 蘸取阿米曲士浓缩液	1.5m×4mm I.D. 3%G1/S1A	氮气	250	FID	角鲨烷	USP (24, p. 121)
十八醇十六醇混合物	2m×3mm I.D. 10%liquid G2/S1	氮气	205	FID	无	NF (19, p. 2434)
鲸蜡醇	2m×3mm I.D. 10%liquid G2/S1A	氮气	205	FID	无	NF (19, p. 2435)
氯碘羟唑 氯碘羟唑乳膏 氯碘羟唑软膏 氯碘羟唑和氢化可的松乳膏 氯碘羟唑和氢化可的松软膏	Glass, 1.83m × 2mm I.D. 3% G3/S1AB(80~100mesh)	氮气	165	FID	苾	USP(24, p. 435, 436,437)
盐酸考来替泊	Glass, 1.8m × 3mm I.D. 0.25% potassium hydroxide and 5% G16/S1A (80~100mesh)	氮气	85	FID	无	USP (24, p. 465)
盐酸双环胺胶囊 盐酸双环胺注射液 盐酸双环胺糖浆 盐酸双环胺片	fused Silica 15m×0.5mm coated with G3(1mm)	氮气	160 ~ 240 20℃/min	FID	非那西丁	USP(24, p. 549, 550,551)
混合雌激素 混合雌激素片 酯化雌激素 酯化雌激素片	15m×0.25mm I.D. fused Silica capillary bonded with G19(0.25mm)	氢气	220	FID	3-O-甲基雌酮	USP (24, p. 681, 682, 683,684)

续表

材料/剂型	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
甘油二十二烷酸酯	1.8m×4mm I.D. 10%liquid G27/S1A	未指定	225	FID	无	NF (19, p. 2462)
愈创甘油醚和磷酸可待因糖浆	0.6m×2mm I.D. 3% liquid G3/S1A (100~120mesh) (For Codeine Phosphate)	氮气	210	FID	重酒石酸二氢可待因酮	USP (24, p. 793)
愈创甘油醚和磷酸可待因糖浆	1.2m×4mm I.D. 37% liquid G6/S1A (100~120mesh) (For Guaifenesin)	氮气	170	FID	邻苯二甲酸二丙酯	USP (24, p. 793)
氯化可的松和耳用乙酸溶液	Glass, 1.8m×2mm I.D. 20% liquid G35/S1A	氮气	115~190 35℃/min	FID	苯甲醚	USP (24, p. 827)
异山梨醇口服液	Glass, 0.6m×3mm I.D. S9	氮气	230	FID	三甘醇	USP (24, p. 935)
全氟溴烷	60m×0.25mm I.D. G2(1mm)	氢气	35~185 20℃/min	FID	无	USP (24, p. 1295)
三氯生	15m×0.53mm I.D. capillary with G3	氮气	34	FID	无	USP (24, p. 1700)
丙戊酸	1.8m×2.0mm I.D. 10% G34/S1A (80~100mesh)	氮气	155	FID	壬酸	USP (24, p. 1732)
丙戊酸胶囊和丙戊酸糖浆	Glass, 1.8m×2mm I.D. 10%G34/S1A (80~100mesh)	氮气	150	FID	联苯	USP(24, p. 1733, 1734)
维生素 E 维生素 E 制剂 维生素 E 胶囊	Glass, 2m×4mm I.D. 2%~5% liquid G2/S1AB(80~10mesh)	氮气	245~265	FID	棕榈酸十六烷酯	USP (24, p. 1747, 1749)
维生素 E 聚乙二醇丁二酸酯	15m×0.25mm I.D. fused Silica capillary with G27(0.25mm)	氮气	260~340 20℃/min	FID	花生酸乙酯	NF (19, p. 25, 35)

表 5 药典将 GC 用于测定挥发性物质、中间体和有关物质的药物原料和制剂品种

材料/剂型	分析物	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
阿莫西林	二甲基苯胺	2m×2mm I.D. 3% G3/silanized S1A	氮气	120	FID	萘	USP (24, p. 129)
阿莫西林	二甲基苯胺	2m×2mm I.D. 3% G3/silanized S1A	氮气	120	FID	萘	USP (24, p. 136)
氨苄青霉素钠	二甲基苯胺	2m×2mm I.D. 3% G3/silanized S1A	氮气	120	FIDN	N-二乙苯胺	USP (24, p. 140)
氨苄青霉素钠	二氯甲烷	glass, 1.8m×4mm I.D. 10% 39/S1A	氮气	65	FID	二氧杂环己烷	USP (24, p. 140)
亚硝酸异戊酯 亚硝酸异戊酯吸入剂	亚硝酸酯	2m×3mm I.D. 25% methyl polysiloxane on suitable calcined diatomate	氮气	80	TCD	无	USP (24, p. 144, 145)
巴氨西林	二甲基苯胺	2m×2mm I.D. 3% G3/silanized S1A	氮气	120	FID	萘	USP (24, p. 189)
盐酸苯乙胺	丙酮和乙醇	1.2m×4mm S3(80~100mesh)	氮气	120	FID	甲醇	USP (24, p. 204)

续表

材料/剂型	分析物	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
氯化溴苯那敏酞剂	有关物质	Glass, 1.2m × 4mm I.D. 3% G3/SIAB	氦气	190	FID	无	USP (24, p. 251)
马来酸布比卡因	残留溶剂	2m×6mm I.D. S3	氮气	175	FID	无	USP (24, p. 256)
盐酸丁醇	丁醚	Stainless steel, 2m × 6mm I.D. 25% liquid G29 3, 3'- thio-dipropionitrile/SIC(30~40mesh)	氦气	85	TCD	无	NF (19, p. 2422)
卡波姆 910 卡波姆 934 卡波姆 934P 卡波姆 940 卡波姆 941 卡波姆 1342		30m × 0.53mm I.D. fused Silica analytical column with G34 (3.0mm) and a 5m × 0.53mm I.D. guard column deactivated with phenylmethyl siloxane	氦气	40 ~ 260 50℃/min	FID	无	NF (19, p. 2426, 2427, 2428)
头孢羟氨苄	二甲基苯胺	2m × 2mm I.D. 3% G3/silanized S1A	氮气	120	FID	萘	USP (24, p. 326)
头孢西丁钠	丙酮和甲醇	Glass, 1.8m×6.3mm I.D. S2, silane treated 60 ~ 80mesh glass beads precolumn	氮气	110	FID	无	USP (24, p. 345)
头孢氨苄	二甲基苯胺	2m × 2mm I.D. 3% G3/silanized S1A	氮气	120	FID	萘	USP (24, p. 361)
头孢氨苄盐酸马来酸	有关物质	Glass, 1.2m × 4mm I.D. 3% G3/SIAB	氦气	190	FID	无	USP (24, p. 392)
马来酸环吡酮胺环吡酮胺乳膏及外用混悬剂	苯甲醇	Glass, 2m × 4mm I.D. 3% G3/SIAB(100~120mesh)	氮气	100	FID	1-壬醇	USP (24, p. 410, 411)
亚胺培南钠	丙酮, 甲醇和异亚丙基丙酮	30m × 0.53mm capillary, G16 1m film	氦气	50~70 8℃/min	FID	n-正丙醇	USP (24, p. 411)
克拉维酸钾	甲醇和叔丁酰胺	30m×0.32mm capillary, G1	氮气	40 ~ 200 55℃/min	FID	无	USP (24, p. 426)
氯贝丁酯	p-氯酚	15m×0.53mm I.D. capillary coated with G1(1.5 m)	氦气	120~180 5℃/min	FID	无	USP (24, p. 442)
邻氯青霉素钠	二甲基苯胺	2m × 2mm I.D. 3% G3/silanized S1A	氮气	120	FID	萘	USP (24, p. 456)
秋水仙碱	残留氯仿和乙酸乙酯	Glass or Stainless Steel, 1.5m × 4mm I.D. 20%G14/S1	氮气	75	FID	n-正丙醇	USP
火棉胶 弹性火棉胶	乙醇	Glass, 1.8m×3.5mm I.D. S3	氦气	150	TCD	1, 2-二氯乙烷	USP (24, p. 469)
环孢霉素 A 注射液 环孢霉素 A 口服液	乙醇	Glass, 2m×2mm I.D. S3	氮气	145 ~ 270 32℃/min	FID	n-正丙醇	USP (24, p. 488, 489)

续表

材料/剂型	分析物	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
地氟烷	有关物质和三氯氟甲烷,二氯氟甲烷,二氯甲烷,氯仿,三氯三氟乙烷和异氟烷	Stainless Steel, 6.1m × 2.4mm I. D. 25%G16/S1A(80~100mesh)	氮气	75	FID	无	USP (24, p. 504)
右溴苯吡丙胺马来酸盐	有关物质	Glass, 1.2m × 4mm I. D. 3% G3/S1AB	氮气	190	FID	无	USP (24, p. 520)
右泛醇马来酸盐	泛内酯	1.8m×2mm I. D. 5%G2/S1A	氮气	170	FID	2, 6-二甲基苯	USP (24, p. 523)
右旋糖酐 40 和右旋糖酐 70 制剂	乙醇和相关杂质	1.8m×2mm I. D. S3	氮气	160	FID	无	USP (24, p. 523)
双氯西林钠	二甲基苯胺	2m × 2mm I. D. 3% G3/silanized S1A	氮气	120	FID	萘	USP (24, p. 548)
二乙二醇单乙醚	环氧乙烷	Glass or Quartz, 30m × 0.32mm I. D. capillary with G1(1.0μm)	氮气	50~180 5℃/min 180~230 30℃/min	FID	无	NF (19, p. 2447)
二甘醇单乙基醚	环氧乙烷	Glass or Quartz, 30m × 0.32mm I. D. capillary with G1(1.0μm)	氮气	50~180 5℃/min 180~230 30℃/min	FID	无	NF (19, p. 2447)
二羟化铝碳酸钠	异丙醇	0.9m×3mm I. D. S3		180	FID	无	USP (24, p. 572)
二甲基碳酸钠	二甲基砷	1.5m×3mm I. D. 10%liquid phase G25/ S1A	氮气	100 ~ 170 10℃/min	FID	二苯基	USP (24, p. 579)和 USP 24-NF19 First Suppl, p. 2608
琥珀酸多西拉敏	中等峰	2m×4mm I. D. 5%G16, 5%G12/S1A(60~80mesh)	氮气	212	FID	无	USP (24, p. 612)
二羟丙茶碱酞剂 二羟丙茶碱和愈创 甘油酞剂	乙醇	Glass, 0.75m × 4mm I. D. 20% G20/S1AB	氮气	85	FID	无	USP (24, p. 618,619)
混合雌激素 酯化雌激素	雌酮,马烯雌酮和17α-马烯雌酮(游离类固醇)	15m × 0.25mm I. D. fused Silica capillary bonded with G19 (0.25mm)	氢气	220	FID	3-O-甲基雌酮	USP (24, p. 681,683)
乙醚	低沸点碳氢化合物	Stainless Steel, 3.7m × 2mm I. D 30%G22/S1C(30~60mesh)	氮气	80	FID	无	USP (24, p. 692)
乙酰胺	2-乙基-甲基琥珀酸无水物和其他杂质	1.8m×6.4mm I. D. 5%G5/ S1A (60~80mesh)	氮气	140	HFD	无	USP (24, p. 695)
依托度酸	乙醇和甲醇	25m × 0.32mm I. D. fused Silica capillary G36(5mm)	氮气	45~280 30℃/min	FID	异丙醇	USP (244, p. 701)

S

续表

材料/剂型	分析物	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
乙酸氟轻松外用溶液	含醇量	Glass, 1.8m × 2mm I. D. S3 (80~120mesh)	氮气或 氦气	130	FID	异丙醇	USP (24, p. 729)
钆双胺	丙酮, 乙醇和异丙醇	30m × 0.32mm I. D. capillary with G43(1.8mm)	氮气	40	FID	次甲基乙基酮	USP 24 -NF19 First Suppl, p. 2618
硫酸双生霉素	甲醇	1.5m × 4mm I. D. S3	氮气	120~140	FID	<i>n</i> -正丙醇	USP (24, p. 765)
甘油	二氯甲烷, 苯, 三氯乙烯, 1,4-二氧杂环己烷, 氯仿, 己烯, 乙二醇	30m × 0.53mm I. D. fused Silica G43(3mm) with a 5m × 0.53mm I. D. Silica guard column (deactivated with phenyl-methylsiloxane)	氮气	40~220 5℃/mm	FID	无	USP (24, p. 780)和NF (19, p. 2461)
单硬脂酸甘油酯	游离的甘油 单酸甘油酯	Glass, 2.4m × 4mm I. D. 2%liquid G16/S1A(80~100mesh)	氮气	190~200	FID	三丁酸甘油酯 棕榈酸十六烷酯	NF (19, p. 2463)
愈创甘油醚和磷酸可待因糖浆	含醇量	1.8m × 2mm I. D. 5% liquid G16/S1A (100~120mesh)	氮气	50~100 20℃/min	FID	丙酮	USP (24, p. 793)
乙酸酐那苄	2,6-二氯苯甲醛	Glass, 1.8m × 3mm I. D. 20%G1/S1A(80~100mesh)	氮气	190	FID	<i>p</i> -氯苯甲醛	USP (24, p. 796)
六氯酚	2,3,7,8-四氯二苯并二噁	Glass, 1m × 2mm I. D. G1/S1	氮气	250	MS	无	USP (24, p. 810)
氢化可的松和乙酸耳用溶液	乙酸	Glass, 1.8m × 2mm I. D. 20% liquid G35/S1A	氮气	115~190 35℃/min	FID	苯甲醚	USP (24, p. 827)
异环磷酰胺	盐酸 2-氯乙胺	1.8m × 2mm I. D. 10% liquid G16, 2%KOH/S1A (80~100mesh)	氮气	140	FID	无	USP (24, p. 861)
亚胺培南	丙酮, 异丙醇	1.8m × 3mm I. D. 10%G16/S5	氮气	70~170 32℃/min	FID	<i>n</i> -正丙醇	USP (24, p. 863)
吡啶美辛钠	丙酮	Glass, 1.8m × 3mm I. D. S3	氮气	165	FID	无	USP (24, p. 878)
碘海醇	甲醇, 异丙醇和甲氧乙醇	Glass, 2m × 2mm I. D. S6	氮气	125~225 最大速率	FID	无	USP (24, p. 900)
碘普胺	乙醇限量	30m × 0.25mm I. D. capillary coated liquid G43(1.4mm)	氮气	40~70 5℃/min 70~220 30℃/min	FID	无	USP (24, p. 904)
碘昔兰 碘昔兰注射液	残留乙醇	10m × 0.53mm I. D. fused Silica capillary/S2	氮气	45~80 5℃/min	FID	无水乙醇	USP (24, p. 911)
右旋糖酐铁注射液	苯酚限量	1.2m × 3mm I. D. 5%G16/S1A	氮气	145	FID	苯甲醇	USP (24, p. 916)

续表

材料/剂型	分析物	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
异氟烷	丙酮, 1-氯-2,2,2-三氟乙基氯二氟甲醚 2,2,2-三氟乙基二氟甲基醚	Nickel or Stainless Steel, 3.7m × 2.4mm I.D. 10%G311 15%G18 on SIC(60~80mesh)	氮气	65~110 4℃/min	FID	乙酸丁酯	USP (24, p. 920)
共沸异丙醇	空气, 二乙醚, 二异丙醚, 丙酮, 异丙醇, 2-丁醇, <i>n</i> -正丙醇, 水	Stainless Steel, 1.8m × 6.4mm I.D. 10%liquid G20/S1A	氮气	55	FID	无	USP (24, p. 927)
异山梨醇	甲乙酮	Glass or Stainless Steel, 0.6m × 2mm I.D. 25%G16 On Unsilanized S1A	氮气	70	FID	甲基异丁基酮	USP (24, p. 934)
盐酸异克舒令	有关物质	Glass, 2m × 3mm I.D. 3% liquid G3/S1A	氮气	215	FID	无	USP (24, p. 940)
羊毛脂	二嗪农, 除线, 溴硫磷乙基, 林旦, 狄氏剂	System I: 30m × 0.53mm I.D. fused Silica bonded with G1 (1.5μm) and a 6m × 0.53mm I.D. uncoated guard column; System II: 30m × 0.53mm I.D. Fused Silica capillary bonded with G3(1μm) and 96m × 0.53mm I.D. uncoated guard column	氮气	200	ECD火焰光度检测器	氯磷硫磷	USP (24, p. 953)
改良羊毛脂	羊毛脂醇单体	50m × 0.33mm I.D. fused Silica capillary bonded with G2(0.5mm) with a 0.5m × 0.32mm I.D. uncoated guard column	氮气	210 ~ 280 3℃/min	FID	无	USP (24, p. 955)
马来酸左丙氧芬	乙酰氧类似物萘磺酸酯	Glass, 0.6m × 3mm I.D. 3% G2/S1AB	氮气	160	FID	<i>n</i> -二十三烷	USP (p. 706)
硬脂酸镁	硬脂酸, 棕榈酸	30m × 0.32mm I.D. fused Silica with G16(0.5mm)	氮气	70~240 5℃/min	FID	无	NF (19, p. 2474)
马拉硫磷洗液	异丙醇	Glass, 1.8m × 2mm I.D. S2(110~120mesh)	氮气	130	FID	乙酸乙酯	USP (24, p. 1012)
美沙拉秦	苯胺, 4-氨基苯酚, 2-氨基苯酚	10m × 0.53mm I.D. fused Silica capillary coated with G27 (2.65mm)	氮气	70 ~ 150 30℃/min	FID	无	USP (24, p. 1045)和 USP 24-NF19 first Suppl, p. 2640
硫酸间羟异丙肾上腺素	异丙醇, 甲醇	2m × 2mm I.D. 0.1% liquid G25/S7(80~10mesh)	氮气	40~200 15℃/min	FID	无	USP (24, p. 1051)
盐酸米托蒽醌	乙醇	Glass, 3m × 2mm I.D. 20%G1 and 0.1%	氮气	50~140 30℃/min	FID	<i>n</i> -正丙醇	USP (24, p. 1121)
单甘油酯和双甘油酯	甘油	Glass, 2.4m × 4mm I.D. 2% liquid G16/S1A(80~100mesh)	氮气	190~200	FID	三丁酸甘油酯	NF (19, p. 2483)

S

续表

材料/剂型	分析物	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
单甘油酯和双甘油酯	单酸甘油酯	Glass, 2.4m×4mm I.D. 2%liquid G27/ S1A(80~100mesh)	氮气	270~280	FID	十六烷棕榈酸酯	NF (19, p. 2483)
盐酸乙吗噻嗪	乙醇	Glass, 1.8m×4mm I.D. S2	氮气	150	FID	无	USP (24, p. 1129)
肉豆蔻醇	羟值	Glass, 2m × 3mm I.D. 10% G2/S1A	氮气	205	FID	无	NF (p. 1952)
盐酸萘替芬凝胶	乙醇	1.5m × 3.2mm I.D. S3 (80 ~ 100mesh)	氮气	170	FID	n-正丙醇	USP (24, p. 1139)
盐酸纳曲酮	溶剂总量(乙醇和甲醇)	Glass, 1.8m × 4mm I.D. S3 (80~100mesh)		150	FID	异丙醇	USP (24, p. 1143)
壬苯醇醚 9	氧乙烯单体	Nickel, 6.4m × 2.1mm I.D. S9 (60~80mesh)	氮气	100	FID	无	USP (24, p. 1194) 和 NF(19, p. 2486)
壬苯醇醚 9	二氧杂环己烷	Glass, 1.8m×2mm I.D. S10	氮气或 氮气	140	FID	无	USP (24, p. 1194), NF (19, p. 2486) 和 USP 24-NF19 First Suppl, p. 2725
辛苯聚醇	氧乙烯单体	Nickel, 6.4m × 2.1mm I.D. S9 (60~80mesh)	氮气	100	FID	无	NF (19, p. 2486)
辛苯聚醇-9	二氧杂环己烷	Glass, 1.8m×2mm I.D. S10	氮气或 氮气	140	FID	无	NF (19, p. 2486) 和 USP24-NF19 First Suppl, p. 2725
氧氟沙星	甲醇,乙醇	30m × 0.53mm I.D. fused Silica column coated with G43(3mm)	氮气	35~90 20℃/min 90~200 40℃/min	FID	n-正丙醇	USP (24, p. 1215)
盐酸氧可酮	乙醇	Glass, 1.8m×4mm I.D. S3 (10~120mesh)	氮气	150	FID	异丙醇	USP (24, p. 1233)
苯妥英钠注射液	丙二醇和乙醇	Glass, 1.8m × 2.0mm I.D. silanised S3(50~80mesh)	氮气	140~190 6℃/min	FID	乙二醇和 甲醇	USP (24, p. 1326)
聚卡波非	乙酸乙酯	10 ft×2mm I.D. 1%G25/S12	氮气	160	FID	甲乙酮	USP (24, p. 1348)
泊洛沙姆	氧乙烯氧丙烯单体和 1,4-二氧杂环己烷的限量	50m × 0.32mm I.D. fused Silica with G27(5mm)	氮气	70 ~ 240 10℃/min	FID	无	NF (19, p. 2492) 和 USP 24-NF19 First Suppl, p. 2725

续表

材料/剂型	分析物	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
聚乙二醇	氧乙烯单体和 1,4-二氧杂环己烷的限量	50m × 0.32mm I. D. fused Silica with G27(5mm)	氮气	70 ~ 250 10℃/min	FID	无	NF (19, p. 2493) 和 USP 24-NF19 First Suppl, p. 2726
聚乙二醇	乙二醇和二甘醇	Stainless Steel, 1.5m × 3mm I. D. 12%G13/S1NS	氮气	165	FID	无	NF (19, p. 2493)
聚乙二醇单甲基醚	氧乙烯和 1,4-二氧杂环己烷	50m × 0.32mm I. D. fused Silica with G27(5 xmm)	氮气	70~250 10℃/min	FID	无	NF (19, p. 2495)
聚乙二醇单甲基醚	乙二醇和二甘醇	1m × 3mm I. D. S2(60~80mesh)	氮气	200	FID	无	NF (19, p. 2495)
聚乙二醇单甲基醚	2-甲氧乙醇	15m × 0.53mm I. D. fused Silica capillary column with G16(1mm)	氮气	70~250 10℃/min	FID	无	NF (19, p. 2495)
聚氧乙烯	氧化乙烯单体	10m × 0.53mm I. D. Capillary Column with G45(20mm)	氮气	70~200 10℃/min	FID	无	NF (19, p. 2497)
聚乙二醇(10)油醚	氧化乙烯单体	Stainless Steel, 1.8m × 3mm I. D. (OD)S3	氮气	160	FID	<i>n</i> -氯丁烷	NF (19, p. 2498)
聚氧乙烯(20)十六烷基-十八烷基醚	氧化乙烯单体	Stainless Steel, 1.8m × 3mm I. D. (OD)S3	氮气	160	FID	<i>n</i> -氯丁烷	NF (19, p. 2499)
盐酸卡马特灵	有关物质	Glass 1m × 2mm I. D. 10% PEG 20 000 and 2%KOH/S1A	氮气	180	FID	无	USP (24, p. 1406)
盐酸普罗帕酮	甲醇,丙酮	30m × 0.53mm I. D. fused Silica column with G43(3mm)and a 5m × 0.53mm I. D. Silica guard column deactivated with phenylmethyl siloxane	氮气	40~240 快速地	FID	无	USP (24, p. 1414)
盐酸右丙氧芬	盐 酸 α -d-2-乙 基-4-二甲氨基-1,2-二苯-甲基丁醇, 烯丙基甲醇, 盐 酸 α -d-4-二甲氨基-1,2-二苯-3-甲基-2-丁醇	Glass or Stainless Steel, 0.6m × 3mm I. D. 3%G2/ S1 AB	氮气	160	FID	<i>n</i> -二十三烷	USP (24, p. 1420)
萘磺酸右丙氧芬	盐 酸 α -d-2-乙 基-4-二甲氨基-1,2-二苯-甲基丁醇, 烯丙基甲醇, 盐 酸 α -d-4-二甲氨基-1,2-二苯-3-甲基-2-丁醇	Glass or Stainless Steel, 0.6m × 3mm. I. D. 3%G2/S1 AB	氮气	160	FID	<i>n</i> -二十三烷	USP (24, p. 1424)

续表

材料/剂型	分析物	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
糖精	甲苯磺酰胺	Glass, 1.8m × 3.2mm I. D. 10% liquid G3/S1AB(100~120mesh)	氮气	210	FID	<i>n</i> -二十三烷	NF (19, p. 2509)
糖精钙	甲苯磺酰胺	Glass, 1.8m × 3.2mm I. D. 10% liquid G3/S1AB(100~120mesh)	氮气	210	FID	<i>n</i> -二十三烷	USP (24, p. 1497)
糖精钠	甲苯磺酰胺	Glass, 1.8m × 3.2mm I. D. 10% liquid G3/S1AB(100~120mesh)	氮气	210	FID	<i>n</i> -二十三烷	USP (24, p. 1498)
双水杨酯	二甲基苯胺	30m × 0.53mm I. D. capillary coated with G42(1mm)	氮气	105	FID	茚	USP (24, p. 1502)
双水杨酯	水杨酸异丙酯, 水杨酸乙酯和水杨酸甲酯	30m × 0.53mm I. D. capillary coated with G42(1mm)	氮气	120	FID	无	USP (24, p. 1502)
蔗糖铝	吡啶, 2-甲基吡啶	10m × 0.53mm I. D. capillary coated with G27(2.65mm)	氮气	50	FID	3-甲基吡啶	USP (24, p. 1555)
羟糖铝	甲醇	Glass, 2m × 4mm I. D. silanized S6 (80~100mesh)	氮气	150	FID	<i>n</i> -正丙醇	NF (19, p. 2527)
枸橼酸舒芬太尼	丙酮	Glass, 1.83m × 4mm I. D. S2	氮气	175	FID	无	USP (24 -NF19 First Suppl. 2658)
枸橼酸他莫昔芬	有关物质	Glass, 1m × 4mm I. D. 5% liquid G17/S1AB(100~120mesh)	氮气	260	FID	无	USP (24, p. 1586)
替卡西林二钠 替卡西林钠	二甲基苯胺	2m × 2mm I. D. 3% G3/silanized S1A	氮气	120	FID	萘	USP (24, p. 1657)
替米考星注射液	丙二醇	15m × 0.53mm I. D. fused Silica with liquid G16(1mm)	氮气	100	FID	十五烷	USP (24, p. 1662)
三氯生	有关物质	15m × 0.53mm I. D. capillary with G3	氮气	34	FID	无	USP (24, p. 1700)
三氯生	2,3,7,8-四氯二苯并二噁 2,3,7,8-四氯二苯并呋喃	30m × 0.53mm I. D. capillary with G3	氮气	80~180 20℃/min 180~270 4℃/min	MS with electron impact ionization	C13 标记的 2,3,7,8-四氯二苯并二噁 C13 标记的 2,3,7,8-四氯二苯并呋喃	USP (24, p. 1700)
华法林钠	异丙醇	Glass, 1.8m × 4mm I. D. S2 (80~100mesh)	氮气	140	FID	<i>n</i> -正丙醇	USP (24, p. 1750)
黄单胞菌胶	异丙醇	Stainless Steel, 1.8 M 3.2mm I. D. silanized S3(80~100mesh)	氮气	165	FID	叔丁醇	NF (19, p. 2537)

续表

材料/剂型	分析物	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
赛拉嗪	丙酮, 异丙醇	1.8m × 2mm I. D. 0.1% G25/ S7 (80~10mesh)	氦气	30~100 10℃/min 100~220 15℃/min	FID	无	USP (24, p. 1756)
木糖醇	其他多元醇	30m × 0.25mm I. D. capillary with G 46(0.25mm)	氦气	170~215 6℃/min 215~270 10℃/min	FID	赤藓糖醇	NF (19, p. 2538)

表 6 药典将 GC 用于测定水含量的药物原料和制剂品种

材料/剂型	分析物	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
丙酮		Stainless Steel, 1.5m × 6mm I. D. S4	氦气	180	TCD	无	NF (19, p. 2409)
碘乙磷硫胆碱滴眼液		Glass, 1.8m × 2mm I. D. silanised S3 (80~100mesh)	氦气	115	TCD	无水甲醇	USP (24, p. 621)
盐酸戈那瑞林		Glass, 1.8m × 2mm I. D. S3 (80 ~ 100mesh)	氦气	100	TCD	无水甲醇	USP (24, p. 784)

表 7 药典将 GC 用于测定异构体、异构纯度和外消旋物比例的药物原料

材料/剂型	分析物	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
酒石酸环丁甲二羟 吗喃	纯度和异构体 的存在	Glass, 1.8m × 4mm I. D. 3%G3/S1	氦气	250	FID	无	USP (24, p. 271)
乙氯维诺	E-乙氯维诺	Glass (pretreated with 10% dimethyldi- chlorosilane in toluene)	氦气	160	TCD	无	USP (24, p. 691)
氟[18F]脱氧葡萄糖 注射液	异构纯度	1.8m × 4mm I. D. 10% G16/S1AB (60~80mesh) 1.8m × 3mm I. D. 4%G2(SF-30), 6% G6 (OV 210)/S1A (80 ~ 100mesh) (Chromosorb W-HP)	氦气	150	FID	无	USP (24, p. 733)
盐酸拉贝洛尔	外消旋物比例	Glass, 1.8m × 2mm I. D. 10% G3/ S1AB(10~120mesh)	氮气	320	FID	无	USP (24, p. 949)
无水乳糖	α,β-异构体含量	Glass, 0.9m × 4mm I. D. 3% liquid G19/S1A	氦气	215	FID	无	NF (19, p. 2470)
酒石酸苯甲曲秦	L-赤构体	25m × 0.25mm I. D. capillary column G1(0.4mm)	氦气	140	FID	无	USP (24, p. 1301)

S

表 8 药典将 GC 用于测定乙醇含量的药物原料和制剂品种

剂 型	参考文献 ¹⁾
对乙酰氨基酚口服液	USP (24, p. 18)
口服溶液至少包含下列三种物质: 对乙酰氨基酚和氯苯那敏, 右美沙芬和苯丙醇胺的盐	USP (24, p. 24)
口服溶液至少包含下列三种物质: 对乙酰氨基酚和氯苯那敏, 右美沙芬和伪麻黄碱的盐	USP (24, p. 31)
对乙酰氨基酚和磷酸可待因口服液	USP (24, p. 35)
对乙酰氨基酚, 氢溴酸右美沙芬, 琥珀酸多西拉敏和盐酸伪麻黄碱口服液	USP (24, p. 37)
氨基甲酸凝胶和外用溶液剂	USP (24, p. 110, 111)
芳香酞	NF (p. 1901)
颠茄酞	USP (24, p. 201) ²⁾
复方安息香酞	USP (24, p. 211)
布塔巴比妥酞剂	USP (24, p. 262)
樟脑酞	USP (24, p. 293)
芳香鼠李流浸膏	USP (24, p. 322)
芳香酞	NF (19, p. 2415)
西诺沙酯洗剂	USP (24, p. 416)
去羟米松凝胶	USP (24, p. 508) ³⁾
地塞米松酞剂	USP (24, p. 512)
地塞米松磷酸钠	USP (24, p. 516) ⁴⁾
地塞米松磷酸钠气雾剂	USP (24, p. 517)
甲磺酰麦角碱口服液	USP (24, p. 656)
红霉素外用溶液剂	USP (24, p. 667)
依托泊苷注射液	USP (24, p. 704)
绿肥皂酞	USP (24, p. 788)
甲磺酸乙基异丙肾上腺素吸入气雾剂	USP (24, p. 919)
盐酸异丙肾上腺素吸入剂	USP (24, p. 928) ⁴⁾
盐酸甲吡咯嗪糖浆	USP (24, p. 1061)
甲基纤维素口服液	USP (24, p. 1080)
硝酸甘油注射液	USP (24, p. 1190)
盐酸地昔帕明口服液	USP (24, p. 1206)
阿片酞	USP (24, p. 1221)
盐酸氧可酮口服液	USP (24, p. 1234) ²⁾
鸦片樟脑酞	USP (24, p. 1263)
欧薄荷酞	USP (24, p. 1295)
苯巴比妥酞剂	USP (24, p. 1306)
氯化钾口服液	USP (24, p. 1358) ²⁾
葡萄糖酸钾酞剂	USP (24, p. 1365)
强的松龙糖浆	USP (24, p. 1381)
泼尼松口服液	USP (24, p. 1388)
泼尼松糖浆	USP (24, p. 1389)
萘磺酸右丙氧芬口服混悬液	USP (24, p. 1425)

续表

剂 型	参考文献 ¹⁾
盐酸伪麻黄碱, 马来酸卡比沙明和氢溴酸右美沙芬口服液	USP 24-NF19, First Suppl, p. 2654)
间苯二酚和硫黄洗液	USP (24, p. 1478)
复方新诺明口服混悬剂	USP (24, p. 1573)
水合肼二酐酐剂 水合肼二酐可待因酐剂	USP (24, p. 1607, 1608)
茶碱和愈创甘油醚口服液	USP (24, p. 1634) ²⁾
茶碱甘氨酸钠酐剂	USP (24, p. 1635)
维生素 B ₁ 酐剂	USP (24, p. 1639) ²⁾
硝酸硫酸酐剂	USP (24, p. 1641) ²⁾
硫柳汞外用气雾剂	USP (24, p. 1644) ⁴⁾
硫柳汞酐	USP (24, p. 1645)
盐酸氨苄噻吨口服液	USP (24, p. 1654)
盐酸吡咯吡胺糖浆	USP (24, p. 1717)
缬草粉末浸膏	USP (24), NF (19, First Suppl, p. 2729)

1) 色谱条件: 色谱柱-Glass 1. 8m×4mm I. D. S3 (100~120mesh) 或者 S8。

2) 内标 -乙腈, 丙酮。

3) 异丙醇。

4) 甲乙酮 400; 载气-氮气或氦气; 注温-120℃; 检测器-FID。

表 9 药典将 GC 用于测定挥发性杂质的原料和制剂品种

原料/剂型	章节≤467≥	参考文献
阿拉伯胶	Method Ib	NF (19, p. 2408)
对乙酰氨基酚	Method Vb	USP (24, p. 17)
乙酰唑胺	Method V	USP (24, p. 40)
乙酸	Method IVb	NF (19, p. 2408)
乙酸己脲	Method V	USP (24, p. 42)
乙羟胺酸	Method I	USP (24, p. 43)
氯乙酰胆碱	Method I	USP (24, p. 44)
乙酰半胱氨酸	Method I	USP (24, p. 45) 和 NF (19, p. 2409)
阿昔洛韦	Method V	USP (24, p. 46)
腺嘌呤	Method V	USP (24, p. 50)
琼脂	Method IV	NF (19, p. 2410)
丙氨酸	Method I	USP (24, p. 52)
硫酸沙丁胺醇	Method I	USP (24, p. 55)
别嘌呤	Method V	USP (24, p. 62)
单硬脂酸铝	Method IV	NF (19, p. 2412)
硫酸铝	Method IV	USP (24, p. 91)
盐酸金刚烷胺	Method I	USP (24, p. 103)
盐酸阿米洛利	Method V	USP (24, p. 107)
氮鲁米特	Method V	USP (24, p. 112)
氨茶碱	Method I	USP (24, p. 115)
盐酸阿米替林	Method I	USP (24, p. 122)



续表

原料/剂型	章节≤467≥	参考文献
异戊巴比妥钠	Method I	USP (24, p. 126)
盐酸阿莫地喹	Method V	USP (24, p. 126, 127)
硫酸苯丙胺	Method I	USP (24, p. 134)
亚硝酸异戊酯	Method V	USP (24, p. 145)
水合戊烯	Method I	NF (19, p. 2414)
茴香脑	Method V	NF (19, p. 2414)
精氨酸	Method I	USP (24, p. 158) 和 NF (19, p. 2415)
盐酸精氨酸	Method I	USP (24, p. 158)
芳香酞	Method I	NF (19, p. 2415)
维生素 C	Method IVx	USP (24, p. 160) 和 NF (19, p. 2415)
抗坏血酸棕榈酸盐	Method IV	NF (19, p. 2415)
阿司匹林	Method IV	USP (24, p. 161)
阿司帕坦	Method IV	NF (19, p. 2415)
阿托品	Method V	USP (24, p. 177)
硫酸阿托品	Method I	USP (24, p. 178)
活性白土	Method IV	USP (24, p. 180)
胶状活性白土		
硫唑嘌呤	Method V	USP (24, p. 184)
巴氯芬	Method IV	USP (24, p. 194)
颠茄浸膏	Method IV	USP (24, p. 199)
苯氟噻嗪	Method V	USP (24, p. 201)
皂土	Method IV	NF (19, p. 2416, 2417, 2418)
纯化皂土		
皂黏土乳		
苯甲醛	Method V	NF (19, p. 2418)
复方苯甲醛酞剂	Method I	NF (19, p. 2419)
苯佐那酯	Method I	USP (24, p. 211)
甲磺酸苄托品	Method I	USP (24, p. 213)
苯甲醇	Method V	NF (19, p. 2420)
苯甲酸苄酯	Method V	USP (24, p. 215) 和 NF (19, p. 2421)
β -胡萝卜素	Method IV	USP (24, p. 216)
倍他米松	Method V	USP (24, p. 217)
氯贝胆碱	Method I	USP (24, p. 229)
生物素	Method V	USP (24, p. 234)
比哌立登	Method IV	USP (24, p. 234)
盐酸比哌立登		
甲磺酸溴隐亭	Method V	USP (24, p. 248)
盐酸溴苯醇胺	Method I	USP (24, p. 251)
马来酸溴苯那敏	Method I	USP (24, p. 251)

续表

原料/剂型	章节 $\leq 467 \geq$	参考文献
白消安	Method V	USP (24, p. 260)
仲丁巴比妥	Method V	USP (24, p. 261)
仲丁巴比妥钠	Method I	USP (24, p. 261)
布他比妥	Method V	USP (24, p. 263)
丁羟茴醚	Method V	NF (19, p. 2422)
丁羟甲苯	Method IV	NF (19, p. 2423)
羟苯丁酯	Method IV	NF (19, p. 2423)
咖啡因	Method I	USP (24, p. 272)
骨化二醇	Method V	USP (24, p. 274)
乙酸钙	Method I	USP (24, p. 275)
碳酸钙	Method IV	USP (24, p. 277) 和 NF (19, p. 2423)
氯化钙	Method I	USP (24, p. 282) 和 NF (19, p. 2423)
枸橼酸钙	Method IV	USP (24, p. 282)
葡庚糖酸钙	Method I	USP (24, p. 283)
葡萄糖酸钙	Method I	USP (24, p. 284)
氢氧化钙	Method IV	USP (24, p. 286)
乳酸钙	Method I	USP (24, p. 287)
乳糖醛酸钙	Method I	USP (24, p. 288)
戊酮酸钙	Method I	USP (24, p. 288)
泛酸钙	Method I	USP (24, p. 289, 290)
泛酸钙消旋体		
磷酸氢钙	Method IV	USP (24, p. 290) 和 NF (19, p. 2423)
多羧钙	Method IV	USP (24, p. 291)
糖二酸钙	Method IV	USP (24, p. 291) 和 NF (19, p. 2424)
硬脂酸钙	Method IV	NF (19, p. 2425)
卡托普利	Method I	USP (24, p. 296)
卡马西平	Method V	USP (24, p. 299)
过氧化氢脲	Method I	USP (24, p. 301)
卡比多巴	Method IV	USP (24, p. 304)
马来酸卡比沙明	Method I	USP (24, p. 305)
卡波姆 934P	Method IV	NF (19, p. 2427)
羧甲基纤维素钙	Method IV	NF (19, p. 2428)
羧甲基纤维素钠	Method IV	USP (24, p. 313) 和 NF (19, p. 2429)
羧甲基纤维素钠 12	Method IV	NF (19, p. 2429)
卡立普多	Method V	USP (24, p. 314)
纤维醋法酯	Method IV	NF (19, p. 2431)
微晶纤维素	Method IV	NF (19, p. 2432)
微晶纤维素和羧甲基纤维素钠	Method IV	NF (19, p. 2433)
粉状纤维素	Method IV	NF (19, p. 2433)

续表

原料/剂型	章节≤467≥	参考文献
醋酸纤维素	Method IV	NF (19, p. 2434)
西吡氯铵	Method V	USP (24, p. 370)
水合氯醛	Method I	USP (24, p. 371)
苯丁酸氮芥	Method V	USP (24, p. 372)
氯氮革	Method IV	USP (24, p. 381, 384)
盐酸氯氮革		
三氯叔丁醇	Method IV	NF (19, p. 2437)
氯喹	Method V	USP (24, p. 388)
磷酸氯喹	Method I	USP (24, p. 389)
氯噻嗪	Method V	USP (24, p. 389)
马来酸氯苯那敏	Method IV	USP (24, p. 392)
氯丙嗪	Method V	USP (24, p. 395)
盐酸氯丙嗪	Method I	USP (24, p. 396)
氯磺丙脲	Method IV	USP (24, p. 398)
氯唑沙宗	Method V	USP (24, p. 403)
维生素 D ₃	Method IV	USP (24, p. 404)
胆固醇	Method IV	NF (19, p. 2438)
考来烯胺树脂	Method IV	USP (24, p. 406)
西咪替丁	Method IV	USP (24, p. 412)
西诺沙星	Method IV	USP (24, p. 415)
枸橼酸	Method IV	USP (24, p. 423) 和 NF (19, p. 2438)
克利溴铵	Method I	USP (24, p. 429)
氯贝丁酯	Method V	USP (24, p. 442)
枸橼酸氯米芬	Method V	USP (24, p. 444)
氯硝西洋	Method V	USP (24, p. 445)
二钾氯氮革	Method I	USP (24, p. 448)
可可豆脂	Method IV	NF (19, p. 2438)
秋水仙碱	Method I	USP (24, p. 464)
玉米油	Method IV	NF (19, p. 2439)
乙酸可的松	Method IV	USP (24, p. 473)
棉子油	Method IV	NF (19, p. 2439)
色甘酸钠	Method I	USP (24, p. 475)
交联羧甲基纤维素钠	Method IV	NF (19, p. 2441)
氯化铜	Method V	USP (24, p. 477)
硫酸铜	Method IV	USP (24, p. 479)
盐酸苯甲噻	Method IV	USP (24, p. 481)
盐酸环苯扎林	Method I	USP (24, p. 481)
盐酸赛庚啶	Method V	USP (24, p. 489)
盐酸半胱氨酸	Method IV	USP (24, p. 490)

续表

原料/剂型	章节≤467≥	参考文献
达那唑	Method V	USP (24, p. 495)
氨苯矾	Method V	USP (24, p. 496)
去氢胆酸	Method V	USP (24, p. 500)
地昔帕明	Method I	USP (24, p. 505)
地塞米松	Method IV	USP (24, p. 512)
醋酸地塞米松	Method V	USP (24, p. 515)
地塞米松磷酸钠	Method IV	USP (24, p. 516)
马来酸右氯苯那敏	Method I	USP (24, p. 520)
马来酸右氯苯那敏	Method I	USP (24, p. 521)
右泛醇	Method IV	USP (24, p. 523)
葡聚糖结合剂	Method I	NF (19, p. 2444)
糊精	Method I	NF (19, p. 2444)
硫酸右旋苯丙胺	Method I	USP (24, p. 528)
葡萄糖赋形剂	Method I	NF (19, p. 2445)
地西洋	Method V	USP (24, p. 538)
二氯磺胺	Method V	USP (24, p. 545)
盐酸双环胺	Method I	USP (24, p. 549)
二乙醇胺	Method IV	NF (19, p. 2446)
盐酸安非拉酮	Method I	USP (24, p. 552)
己烯雌酚	Method V	USP (24, p. 554)
二磷酸己烯雌酚	Method V	USP (24, p. 555)
二氟尼柳	Method V	USP (24, p. 558)
洋地黄粉末	Method IV	USP (24, p. 560)
洋地黄		
双氢速留醇	Method IV	USP (24, p. 568)
甘羟铝	Method IV	USP (24, p. 570)
碳酸二羟铝钠	Method IV	USP (24, p. 572)
盐酸地尔硫草	Method IV	USP (24, p. 573)
茶苯海明	Method V	USP (24, p. 576)
枸橼酸苯海拉明	Method V	USP (24, p. 582)
盐酸苯海拉明	Method I	USP (24, p. 583)
双嘧达莫	Method IV	USP (24, p. 590)
磷酸双异丙吡胺	Method I	USP (24, p. 593)
双硫仑	Method V	USP (24, p. 594)
盐酸多塞平	Method I	USP (24, p. 604)
琥珀酸多西拉敏	Method I	USP (24, p. 612)
二羟丙茶碱	Method I	USP (24, p. 618)
马来酸依那普利	Method IV	USP (24, p. 638)
麻黄碱	Method I	USP (24, p. 642, 643)

S

续表

原料/剂型	章节≤467≥	参考文献
盐酸麻黄碱		
硫酸麻黄碱		
维生素 D ₂	Method V	USP (24, p. 651)
混合雌激素	Method V	USP (24, p. 681, 683)
酯化雌激素		
哌嗪雌酮硫酸酯	Method V	USP (24, p. 686)
依他尼酸	Method V	USP (24, p. 688)
盐酸乙胺丁醇	Method I	USP (24, p. 689)
乙硫异烟胺	Method V	USP (24, p. 694)
乙琥胺	Method I	USP (24, p. 695)
乙酸乙酯	Method I	NF (19, p. 2450)
	30m×0.53mm I. D. fused Silica column with G16 (1μm)	
乙基香草醛	Method IV	NF (19, p. 2450)
乙基纤维素	Method IV	NF (19, p. 2451)
乙基纤维素	Method V	NF (19, p. 2451)
水分散体		
羟苯乙酯	Method IV	NF (19, p. 2452)
氨茶碱	Method V	USP (24, p. 698)
双醋炔诺醇	Method IV	USP (24, p. 698)
羟乙二磷酸二钠	Method I	USP (24, p. 700)
盐酸尤卡托品	Method I	USP (24, p. 706)
法莫替丁	Method V	USP (24, p. 707)
非诺洛芬	Method V	USP (24, p. 708)
延胡索酸亚铁	Method IV	USP (24, p. 7111)
葡萄糖酸亚铁	Method I	USP (24, p. 712)
干硫酸亚铁	Method IV	USP (24, p. 715)
硫酸亚铁		
氟胞嘧啶	Method V	USP (24, p. 719)
盐酸氟西汀	Method IV	USP (24, p. 738)
氟甲睾酮	Method V	USP (24, p. 740)
盐酸氟奋乃静	Method I	USP (24, p. 743)
盐酸氟西洋	Method I	USP (24, p. 746)
氟比洛芬钠	Method I	USP (24, p. 749)
叶酸测定	Method IV	USP (24, p. 752)
富马酸	Method V	NF (19, p. 2453)
呋噻米	Method V	USP (24, p. 756)

续表

原料/剂型	章节≤467≥	参考文献
鹿角菜胶	Method IV	NF (19, p. 2454)
吉非贝齐	Method V	USP (24, p. 763)
液状葡萄糖	Method I	NF (19, p. 2461)
甘油二十二烷酸酯	Method IV	NF (19, p. 2462)
单硬脂酸甘油酯	Method IV	NF (19, p. 2463)
甘氨酸	Method I	USP (24, p. 782) 和 NF (19, p. 2464)
灰黄霉素	Method V	USP (24, p. 788)
愈创甘油醚	Method IV	USP (24, p. 791)
瓜尔胶	Method IV	NF (19, p. 2464)
乙酸氯压胍	Method V	USP (24, p. 796)
硫酸胍那决尔	Method I	USP (24, p. 797)
硫酸胍乙啶	Method I	USP (24, p. 799)
氟哌啶醇	Method V	USP (24, p. 804)
甲溴后马托品	Method I	USP (24, p. 815)
盐酸胍苯吡嗪	Method I	USP (24, p. 818)
氢氯噻嗪	Method V	USP (24, p. 820)
重酒石酸二氢可待因酮	Method I	USP (24, p. 821)
氢化可的松	Method IV	USP (24, p. 824)
氢可松磷酸酯钠	Method I	USP (24, p. 831)
氢氟噻嗪	Method V	USP (24, p. 835)
氢醌	Method I	USP (24, p. 838)
硫酸羟氯喹	Method I	USP (24, p. 841)
羟乙基纤维素	Method IV	NF (19, p. 2465)
羟丙纤维素	Method IV	NF (19, p. 2465)
羟丙甲纤维素	Method IV	USP (24, p. 843) 和 NF (19, p. 2466)
羟基脲	Method I	USP (24, p. 844)
盐酸羟嗪	Method I	USP (24, p. 846)
双羟萘酸羟嗪	Method V	USP (24, p. 848)
羟丙甲纤维素邻苯二甲酸酯	Method IV	NF (19, p. 2467)
硫酸莨菪碱	Method I	USP (24, p. 851)
布洛芬	Method V	USP (24, p. 854)
咪脲	Method I	NF (19, p. 2467)
盐酸丙米嗪	Method I	USP (24, p. 865)
吲达帕胺	Method IV	USP (24, p. 867)
吲哚美辛	Method IV	USP (24, p. 874)
碘普胺	Method IV	USP (24, p. 904)
异亮氨酸	Method I	USP (24, p. 923)
异烟肼	Method I	USP (24, p. 924)
异丙碘铵	Method I	USP (24, p. 926)

S

续表

原料/剂型	章节≤467≥	参考文献
异丙基肉豆蔻酸酯	Method IV	NF (19, p. 2468)
棕榈酸异丙酯	Method IV	NF (19, p. 2468)
盐酸异丙肾上腺素	Method I	USP (24, p. 928)
硫酸异丙肾上腺素	Method I	USP (24, p. 932)
13-顺式维生素 A 酸	Method V	USP (24, p. 938)
盐酸异克舒令	Method V	USP (24, p. 940)
酮康唑	Method IV	USP (24, p. 945)
酮洛芬	Method IV	USP (24, p. 946)
酮咯酸氨丁三醇	Method V	USP (24, p. 947)
盐酸柳胺苄心定	Method I	USP (24, p. 949)
拉克替醇	Method IV	NF (19, p. 2469)
卵磷脂	Method IV	NF (19, p. 2471)
左去氧麻黄碱	Method I	USP (24, p. 959)
左旋多巴	Method IV	USP (24, p. 963)
氧化钙	Method IV	USP (24, p. 974)
碳酸锂	Method I	USP (24, p. 981)
枸橼酸锂	Method V	USP (24, p. 983)
氢氧化锂	Method V	USP (24, p. 984)
琥珀酸洛沙平	Method V	USP (24, p. 993)
乙酸赖氨酸	Method I	USP (24, p. 994)
盐酸赖氨酸	Method I	USP (24, p. 994)
乙酸甲磺灭脓	Method V	USP (24, p. 995)
镁加铝	Method V	USP (24, p. 996)
氯化镁	Method I	USP (24, p. 1002)
枸橼酸镁	Method IV	USP (24, p. 1003)
葡萄糖酸镁	Method I	USP (24, p. 1004)
水杨酸镁	Method I	USP (24, p. 1008)
硅酸镁	Method IV	NF (19, p. 2473)
硬脂酸镁	Method IV	NF (19, p. 2473)
硫酸镁	Method I	USP (24, p. 1009)
苹果酸	Method I	NF (19, p. 2475)
扁桃酸	Method IV	USP (24, p. 1012)
二氯化锰	Method I	USP (24, p. 1012)
葡萄糖酸锰	Method I	USP (24, p. 1013)
硫酸锰	Method I	USP (24, p. 1014)
盐酸马普替林	Method V	USP (24, p. 1016)
盐酸美卡拉明	Method I	USP (24, p. 1023)
盐酸氯苯苄嗪	Method IV	USP (24, p. 1025)
甲氧胺苯酸钠	Method I	USP (24, p. 1027)

续表

原料/剂型	章节≤467≥	参考文献
乙酸甲地孕酮	Method IV	USP (24, p. 1030)
美法仑	Method IV	USP (24, p. 1032)
薄荷脑	Method V	USP (24, p. 1038)
盐酸哌替啶	Method I	USP (24, p. 1039)
美芬妥因	Method V	USP 24-NF19 First Suppl. (p. 2639)
甲丙氨酯	Method V	USP (24, p. 1043)
疏嘌呤	Method V	USP (24, p. 1044)
苯磺酸美索达嗪	Method I	USP (24, p. 1048)
硫酸间羟异丙肾上腺素	Method IV	USP (24, p. 1051)
甲基丙烯酸共聚物	Method V	NF (19, p. 2477)
盐酸美沙酮	Method I	USP (24, p. 1056)
盐酸去氧麻黄碱	Method I	USP (24, p. 1058)
醋甲唑胺	Method I	USP (24, p. 1060)
盐酸甲地噻	Method I	USP (24, p. 1061)
乌洛托品	Method I	USP (24, p. 1062, 1063, 1064)
马尿酸乌洛托品		
扁桃酸乌洛托品		
甲巯咪唑	Method I	USP (24, p. 1066)
蛋氨酸	Method I	USP (24, p. 1067)
美索巴莫	Method V	USP (24, p. 1067)
甲氨蝶呤	Method V	USP (24, p. 1070)
甲氧沙林	Method V	USP (24, p. 1073)
甲琥胺	Method V	USP (24, p. 1075)
水杨酸甲酯	Method IV	NF (19, p. 2479)
甲基纤维素	Method V	USP (24, p. 1079) 和 NF (19, p. 2480)
甲基多巴	Method V	USP (24, p. 1080)
亚甲蓝	Method I	USP (24, p. 1085)
包衣片中的二氯甲烷	Method V	USP (24, p. 1878)
羟苯甲酯	Method IV	NF (19, p. 2480)
羟苯甲酯钠	Method I	NF (19, p. 2481)
盐酸哌甲酯	Method I	USP (24, p. 1088)
甲睾酮	Method V	USP (24, p. 1094)
盐酸甲氧氯普胺	Method I	USP (24, p. 1097)
富马酸美托洛尔	Method I	USP (24, p. 1100)
酒石酸美托洛尔	Method I	USP (24, p. 1101)
甲酪氨酸	Method IV	USP (24, p. 1108)
盐酸美西律	Method I	USP (24, p. 1109)
米诺地尔	Method IV	USP (24, p. 1118)
邻氯苯对氯苯二氯乙烷	Method V	USP (24, p. 1120)

S

续表

原料/剂型	章节≤467≥	参考文献
乙醇胺	Method I	NF (19, p. 2484)
谷氨酸钠	Method I	NF (19, p. 2484)
二羟基丙硫醇	Method IV	NF (19, p. 2484)
盐酸乙吗噻嗪	Method V	USP (24, p. 1129)
硫酸吗啡	Method I	USP (24, p. 1131)
纳多洛尔	Method IV	USP (24, p. 1134)
癸酸诺龙	Method V	USP (24, p. 1144)
苯丙酸诺龙	Method V	USP (24, p. 1145)
萘普生	Method V	USP (24, p. 1147)
甲氧萘丙酸钠	Method I	USP (24, p. 1149)
烟酸	Method IV	USP (24, p. 1176)
烟酰胺	Method I	USP (24, p. 1179)
硝苯地平	Method V	USP (24, p. 1183)
炔诺酮	Method IV	USP (24, p. 1196)
醋酸炔诺酮	Method IV	USP (24, p. 1199)
异炔诺酮	Method V	USP (24, p. 1202)
盐酸去甲替林	Method I	USP (24, p. 1206)
辛苯聚醇	Method IV	NF (19, p. 2486)
辛基十二烷醇	Method V	NF (19, p. 2486)
油酸	Method IV	NF (19, p. 2486)
维生素 A、D 油	Method V	USP (24, p. 1217)
橄榄油	Method IV	NF (19, p. 2487)
奥美拉唑	Method IV	USP (24, p. 1217)
氧雄龙	Method V	USP (24, p. 1225)
奥沙西洋	Method V	USP (24, p. 1226)
盐酸心得平	Method I	USP (24, p. 1228)
胆茶碱	Method I	USP (24, p. 1229)
奥昔布宁	Method I	USP (24, p. 1232)
羟甲烯龙	Method V	USP (24, p. 1242)
硫酸羟喹啉	Method I	NF (19, p. 2487)
泛醇	Method I	USP (24, p. 1258)
盐酸罂粟碱	Method IV	USP (24, p. 1260)
花生油	Method IV	NF (19, p. 2488)
果胶	Method IV	USP (24, p. 1265) 和 NF (19, p. 2489)
戊巴比妥	Method V	USP (24, p. 1293)
戊巴比妥钠	Method I	USP (24, p. 1294)
薄荷油	Method IV	NF (19, p. 2489)
薄荷水	Method I	NF (19, p. 2490)
奋乃静	Method V	USP (24, p. 1296)

续表

原料/剂型	章节≤467≥	参考文献
酒石酸苯甲曲秦	Method I	USP (24, p. 1301)
硫酸苯乙肼	Method I	USP (24, p. 1303)
马来酸苯吡丙胺	Method IV	USP (24, p. 1304)
盐酸芬美曲秦	Method I	USP (24, p. 1304)
苯巴比妥	Method V	USP (24, p. 1305)
苯巴比妥钠	Method I	USP (24, p. 1307)
苯酚 液体苯酚	Method I	USP (24, p. 1308)
盐酸酚苄明	Method V	USP (24, p. 1308)
苯琥胺	Method V	USP (24, p. 1309)
盐酸芬特明	Method I	USP (24, p. 1310)
苯丙氨酸	Method I	USP (24, p. 1313)
保泰松	Method V	USP (24, p. 1313)
苯乙醇	Method IV	USP (24, p. 1318) 和 NF (19, p. 2490)
乙酸苯汞	Method IV	NF (19, p. 2490)
硝酸苯汞	Method IV	NF (19, p. 2490)
苯丙醇胺	Method I	USP (24, p. 1318, 1319)
盐酸苯丙醇胺		
苯妥英 苯妥英钠	Method V	USP (24, p. 1322, 1324)
匹莫齐特	Method V	USP (24, p. 1335)
吡啶洛尔	Method V	USP (24, p. 1336)
吡罗昔康	Method V	USP (24, p. 1342)
聚克立林钾	Method IV	NF (19, p. 2492)
聚卡波非	Method IV	USP (24, p. 1348)
泊洛沙姆	Method V	NF (19, p. 2492)
聚乙二醇	Method IV	NF (19, p. 2493)
聚氧化乙烯	Method I	NF (19, p. 2497)
聚乙二醇 (10) 油醚	Method V	NF (19, p. 2498)
聚氧乙烯 (20) 十六烷基-十八烷基醚	Method I	NF (19, p. 2499)
聚氧乙烯 (35) 蓖麻油	Method I	NF (19, p. 2500)
聚氧乙烯 (40) 氢化蓖麻油	Method I	NF (19, p. 2501)
聚氧乙烯单硬脂酸酯	Method I	NF (19, p. 2501)
聚山梨酯-20, 聚山梨酯-40	Method IV	NF (19, p. 2501, 2502)
聚山梨酯-60, 聚山梨酯-80		
聚乙酸乙烯邻苯二甲酸酯	Method IV	NF (19, p. 2502)
聚乙烯醇	Method I	USP (24, p. 1352) 和 NF (19, p. 2503)
含硫钾	Method IV	USP (24, p. 1353)
苯甲酸钾	Method I	NF (19, p. 2503)
碳酸氢钾	Method IV	USP (24, p. 1354)
碳酸钾	Method I	USP (24, p. 1357) 和 NF (19, p. 2503)
氯化钾	Method I	USP (24, p. 1357) 和 NF (19, p. 2503)

S

续表

原料/剂型	章节≤467≥	参考文献
枸橼酸钾	Method I	USP (24, p. 1362) 和 NF (19, p. 2503)
葡萄糖酸钾	Method I	USP (24, p. 1364)
碘化钾	Method I	USP (24, p. 1368)
偏亚硫酸氢盐	Method V	NF (19, p. 2503)
高氯酸钾	Method I	USP (24, p. 1370)
磷酸二氢钾	Method I	NF (19, p. 2504)
山梨酸钾	Method I	NF (19, p. 2504)
哌唑嗪	Method IV	USP (24, p. 1379)
伯氨唑	Method I	USP (24, p. 1391)
扑米酮	Method V	USP (24, p. 1392)
丙磺舒	Method V	USP (24, p. 1393)
普罗布考	Method V	USP (24, p. 1395)
盐酸普鲁卡因胺	Method I	USP (24, p. 1397)
盐酸丙卡巴肼	Method I	USP (24, p. 1403)
乙二磺酸甲呱氯丙嗪	Method I	USP (24, p. 1405)
马来酸丙氯拉嗪	Method V	USP (24, p. 1406)
盐酸丙环定	Method V	USP (24, p. 1406)
脯氨酸	Method I	USP (24, p. 1409)
盐酸丙嗪	Method I	USP (24, p. 1410)
溴丙胺太林	Method I	USP (24, p. 1415)
丙酸	Method I	NF (19, p. 2505)
盐酸右丙氧芬	Method I	USP (24, p. 1420)
萘磺酸丙氧芬	Method V	USP (24, p. 1424)
盐酸普萘洛尔	Method I	USP (24, p. 1428)
没食子酸丙酯	Method V	NF (19, p. 2506)
碳酸丙烯	Method I	NF (19, p. 2506)
丙二醇	Method IV	USP (24, p. 1434) 和 NF (19, p. 2506)
1, 2-丙二醇单硬脂酸酯	Method IV	NF (19, p. 2507)
尼泊金丙酯	Method IV	NF (19, p. 2508)
尼泊金丙酯钠	Method I	NF (19, p. 2508)
丙硫氧嘧啶	Method V	USP (24, p. 1436)
盐酸普罗替林	Method I	USP (24, p. 1439)
盐酸伪麻黄碱	Method V	USP (24, p. 1439)
吡嗪酰胺	Method I	USP (24, p. 1444)
溴吡斯的明	Method I	USP (24, p. 1446)
维生素 B ₆	Method I	USP (24, p. 1447)
马来酸吡拉明	Method I	USP (24, p. 1449)
乙胺嘧啶	Method V	USP (24, p. 1450)
火棉	Method V	USP (24, p. 1451)

续表

原料/剂型	章节 $\leq 467 \geq$	参考文献
奎尼丁葡萄糖酸盐	Method I	USP (24, p. 1453, 1456)
硫酸奎尼丁		
硫酸奎宁	Method IV	USP (24, p. 1458)
消旋肾上腺素	Method V	USP (24, p. 1461)
消旋盐酸肾上腺素	Method I	USP (24, p. 1462)
盐酸雷尼替丁	Method I	USP (24, p. 1462)
罗芙碱	Method IV	USP (24, p. 1466)
间苯二酚	Method IV	USP (24, p. 1478)
单乙酸雷琐辛	Method I	USP (24, p. 1479)
维生素 B ₂	Method IV	USP (24, p. 1480)
核黄素磷酸钠	Method IV	USP (24, p. 1482)
利美索龙	Method V	USP (24, p. 1487)
盐酸利托君	Method I	USP (24, p. 1493)
薷薇水	Method I	NF (19, p. 2508)
糖精	Method V	NF (19, p. 2509)
糖精钙	Method I	USP (24, p. 1497) 和 NF (19, p. 2509)
糖精钠	Method IV	USP (24, p. 1498)
水杨酰胺	Method V	USP (24, p. 1499)
双水杨酯	Method V	USP (24, p. 1502)
氢溴酸东莨菪碱	Method I	USP (24, p. 1507)
司可巴比妥	Method V	USP (24, p. 1509)
司可巴比妥钠	Method I	USP (24, p. 1510)
亚硒酸	Method I	USP (24, p. 1514)
丝氨酸	Method I	USP (24, p. 1517)
麻油	Method IV	NF (19, p. 2512)
二氧化硅	Method IV	NF (19, p. 2514)
胶态二氧化硅		
西甲硅油	Method IV	USP (24, p. 1518) 和 NF (19, p. 2515)
乙酸钠	Method IV	USP (24, p. 1524)
抗坏血酸钠	Method I	USP (24, p. 1525) 和 NF (19, p. 2515)
苯甲酸钠	Method IV	NF (19, p. 2516)
碳酸氢钠	Method IV	USP (24, p. 1525) 和 NF (19, p. 2516)
硼砂	Method I	NF (19, p. 2516)
丁酸钠	Method I	USP (24-NF19) First Suppl (p. 2657)
碳酸钠	Method I	NF (19, p. 2516)
甲醋吡喃酮钠	Method I	NF (19, p. 2516)
氟化钠	Method I	USP (24, p. 1532)
甲醛次硫酸钠	Method I	NF (19, p. 2517)
碘化钠	Method I	USP (24, p. 1535)

S

续表

原料/剂型	章节 $\leq 467 \geq$	参考文献
月桂硫酸钠	Method IV	NF (19, p. 2517)
氟磷酸钠	Method I	USP (24, p. 1536)
磷酸二氢钠	Method I	USP (24, p. 1540) 和 NF (19, p. 2518)
丙酸钠	Method I	NF (19, p. 2518)
水杨酸钠	Method I	USP (24, p. 1542)
硬脂酸钠	Method I	NF (19, p. 2519)
硬脂酰醇富马酸钠	Method IV	NF (19, p. 2519)
山梨酸	Method IV	NF (19, p. 2520)
司盘 20	Method V	NF (19, p. 2520)
司盘 80	Method IV	NF (19, p. 2521)
司盘 40	Method IV	NF (19, p. 2521)
司盘 60	Method IV	NF (19, p. 2522)
山梨醇	Method IV	NF (19, p. 2522)
螺内酯	Method V	USP (24, p. 1546)
司坦唑醇	Method V	USP (24, p. 1549)
淀粉	Method IV	NF (19, p. 2524, 2525)
预胶化淀粉		
硬脂酸	Method V	NF (19, p. 2525)
纯化硬脂酸		
苏合香酯	Method IV	USP (24, p. 1551)
蔗糖	Method IV	NF (19, p. 2527)
可压缩糖	Method IV	NF (19, p. 2528, 2529)
糖果剂的糖		
糖球		
磺胺甲噁唑	Method IV	USP (24, p. 1571)
磺胺吡啶	Method V	USP (24, p. 1575)
柳氮磺吡啶	Method V	USP (24, p. 1576)
磺吡酮	Method V	USP (24, p. 1578)
磺胺乙酰异噁唑	Method IV	USP (24, p. 1580)
舒林酸糖浆	Method V	USP (24, p. 1581)
	Method I	NF (19, p. 2530)
枸橼酸他莫昔芬	Method V	USP (24, p. 1586)
鞣酸	Method I	USP (24, p. 1588)
酒石酸	Method I	NF (19, p. 2530)
硫酸特布他林	Method I	USP (24, p. 1604)
睾内酯	Method V	USP (24, p. 1608)
睾酮	Method V	USP (24, p. 1610)
环戊丙酸睾酮	Method V	USP (24, p. 1610)
庚酸睾酮	Method V	USP (24, p. 1611)

续表

原料/剂型	章节≤467≥	参考文献
丙酸睾丸酮	Method IV	USP (24, p. 1612)
茶碱	Method V	USP (24, p. 1628)
甘氨酸碱钠	Method I	USP (24, p. 1635)
维生素 B ₁	Method IV	USP (24, p. 1639)
硝酸硫胺	Method IV	USP (24, p. 1641)
马来酸硫乙哌丙嗪	Method V	USP (24, p. 1642)
硫鸟嘌呤	Method V	USP (24, p. 1646)
硫利达嗪	Method V	USP (24, p. 1648)
盐酸硫利达嗪	Method IV	USP (24, p. 1649)
替沃噻吨	Method V	USP (24, p. 1651)
盐酸氨苄噻吨	Method I	USP (24, p. 1653)
苏氨酸	Method V	USP (24, p. 1654)
麝香草酚	Method IV	NF (19, p. 2530)
马来酸噻吗洛尔	Method I	USP (24, p. 1663)
二氧化钛	Method IV	USP (24, p. 1666)
盐酸妥卡胺	Method I	USP (24, p. 1672)
维生素 E 赋形剂	Method IV	NF (19, p. 2531)
妥拉磺脲	Method V	USP (24, p. 1674)
甲苯磺丁脲	Method IV	USP (24, p. 1676)
托美丁钠	Method I	USP (24, p. 1677)
西黄蓍胶	Method IV	NF (19, p. 2531)
乙酸去甲雄三烯醇酮	Method IV	USP (24, p. 1683)
三戊胺	Method IV	USP (24, p. 1692)
盐酸曲恩汀	Method I	USP (24, p. 1701)
盐酸三氟拉嗪	Method I	USP (24, p. 1703)
三氟丙嗪	Method V	USP (24, p. 1704)
盐酸三氟丙嗪	Method I	USP (24, p. 1705)
盐酸苯海索	Method IV	USP (24, p. 1707)
三甲沙林	Method V	USP (24, p. 1715)
盐酸曲吡那敏	Method I	USP (24, p. 1716)
盐酸曲普利啶	Method V	USP (24, p. 1716)
三乙醇胺	Method I	NF (19, p. 2533)
氨丁三醇	Method V	USP (24, p. 1721) 和 NF (19, p. 2533)
色氨酸	Method IV	USP (24, p. 1724)
泰洛沙泊	Method I	USP (24, p. 1727) 和 NF (19, p. 2533)
酪氨酸	Method IV	USP (24, p. 1728)
缬氨酸	Method I	USP (24, p. 1732)
丙戊酸	Method V	USP (24, p. 1732)
香草醛	Method IV	NF (19, p. 2534)

S

续表

原料/剂型	章节≤467≥	参考文献
氢化植物油	Method IV	NF (19, p. 2534)
盐酸维拉帕米	Method V	USP (24, p. 1739)
维生素 E	Method IV	USP (24, p. 1747)
维生素 E 聚乙二醇丁二酸酯	Method I	NF (19, p. 2535)
华法林钠	Method I	USP (24, p. 1750)
缬草粉末浸膏	Method I	USP (24-NF19) First Suppl. (p. 2728)
巴西棕榈蜡	Method IV	NF (19, p. 2536)
微晶蜡	Method IV	NF (19, p. 2536)
黄单胞菌胶	Method IV	NF (19, p. 2537)
木糖醇	Method I	NF (19, p. 2538)
木糖	Method I	USP (24, p. 1760) 和 NF (19, p. 2539)
玉米朊	Method IV	NF (19, p. 2539)
齐多夫定	Method V	USP (24, p. 1763)
乙酸锌	Method I	USP (24, p. 1766)
氯化锌	Method I	USP (24, p. 1766)
葡萄糖酸锌	Method I	USP (24, p. 1767)
硬脂酸锌	Method IV	USP (24, p. 1769)

表 10 不同方法的色谱条件

	方法 I	方法 IV	方法 V	方法 VI
分析物	苯, 氯仿, 1, 4-二氧杂环己烷, 二氯甲烷, 三氯乙烯	苯, 氯仿, 1, 4-二氧杂环己烷, 二氯甲烷, 三氯乙烯	苯, 氯仿, 1, 4-二氧杂环己烷, 二氯甲烷, 三氯乙烯	二氯甲烷, 三氯乙烯 二氯甲烷, 三氯乙烯
色谱柱	30m×0.53mm I.D. fused Silica analytical column with G27 (5mm) and a 5m×0.53mm I.D. guard column deactivated with Phenyl-methyl Siloxane	30m×0.53mm I.D. fused Silica analytical column with G43 (3.0mm) and a 5m×0.53mm I.D. guard column deactivated with Phenyl-methyl Siloxane	30m×0.53mm I.D. fused Silica analytical column with G43 (3.0mm) and a 5m×0.53mm I.D. guard column deactivated with Phenyl-methyl Siloxane	A: 2m×3mm I.D. S3; temperature: 190°C B: 2.1m×3mm I.D. S2; temperature: 160°C C: 30m×0.53mm I.D. G16; temperature: 40°C D: 2m×3mm I.D. G39; temperature: 65°C E: 2m×3mm I.D. G16; temperature: 70°C F: 2.5m×2mm I.D. S4; temperature: 120~200°C (2°C/min) H: 2.5m×2mm I.D. G14; temperature:

续表

方法 I	方法 IV	方法 V	方法 VI
			45~120℃ (8℃/min) I: 30m×0.53mm I.D. G27; temperature: 35 ~ 175℃ (8℃/min) 175~260℃ (35℃/min) J: 30m×0.33mm I.D. G16; temperature: 50~165℃ (6℃/min)
载气	氦气或氮气	氦气	氦气
温度/℃	35~175 (8/min), 175~260 (35/min)	40~240 (快速地)	40~240 (快速地)
检测器	FID	FID	FID
内标	无	无	无
操作	进样 1μL	使用加热气密进样器顶空进样	进样 1μL

表 11 药典使用 GC 的其他药物原料和剂型

原料/剂型	色谱柱	载气	温度/℃	检测器	内标	参考文献
可可豆脂 (脂肪酸混合物)	15m × 0.25mm fused Silica capillary with G 19 (0.25mm)	氮气	180~240 10℃/min	FID	无	NF (19, p. 2438)
玉米油 (脂肪酸混合物)	Glass, 1.8m×4mm I.D. 10% liquid G 4/S1A	氮气	175	FID	无	NF (19, p. 2439)
马来酸右氯苯那敏片 (溶出速率)	1.8m × 2mm I.D. 1.2% G16, 0.5%KOH/S1AB	氮气	205	FID	马来酸右溴苯那敏	USP (24, p. 522)
脂肪酸混合物	30m×0.53mm I.D. Fused Silica with G16 (1mm)	氮气	70~260 5℃/min	FID	无	USP (24, p. 1871)
盐酸美加明片 (溶出速率)	30m×0.53mm I.D. capillary coated with G 27 (1~5mm)	氮气	150	FID	联苯	USP (24, p. 1023)
有机磷杀虫剂 (见表 5 USP 24, p. 1890)	30m×0.53mm I.D. fused Silica with G1 (0.25mm)	氢气, 氮气 或氮气	80~150 30℃/min 150~280 4℃/min	Alkali Fid or FPD	无	USP (24, p. 1889)
有机氯合成除虫菊酯杀虫剂 (见表 6 USP24, p. 1890)	30m×0.32mm I.D. fused Silica with G1 (0.25mm)	氢气, 氮气 或氮气	80~150 30℃/min 150~280 4℃/min	ECD	无	USP (24, p. 1890)
沙巴棕 (脂肪酸含量) 沙巴棕粉末 (脂肪酸含量)	30m×0.25mm I.D. fused Silica capillary with G16 (0.25mm)	氮气	120~220 50℃/min	FID	十九烷	NF (19, p. 2510, 2512)
红花油 (脂肪酸含量)	Glass, 1.5m×4mm I.D. 10% liquid G4/S1A	氮气	175	FID	无	USP (24, p. 1499)
大豆油 (脂肪酸含量)	Glass, 1.5m×4mm I.D. 10% liquid G4/S1A	氮气	175	FID	无	USP (24, p. 1544), NF (19, p. 2524)



注:

USP 24 NF-19 2000^[21]的固定相

- G1 二甲基硅油
G2 二甲基聚硅氧烷胶
G3 50%苯-50%甲基聚硅氧烷
G4 二甘醇琥珀酸聚酯
G5 3-氰丙基聚硅氧烷
G6 三氟丙甲基聚硅氧烷
G7 50%3-氰丙基-50%苯甲硅酮
G8 90%3-氰丙基-10%苯甲硅酮
G9 甲基烯基聚硅氧烷
G10 由 C₃₆二羧酸和 1, 3-二-4-哌啶丙烷和哌啶以各自摩尔比值 1.00 : 0.90 : 0.20 反应得到的聚酰胺
G11 双(2-乙基己基)癸二酸聚酯
G12 苯基二乙醇胺琥珀酸聚酯
G13 山梨醇
G14 聚乙二醇(平均相对分子质量 950~1050)
G15 聚乙二醇(平均相对分子质量 3000~3700)
G16 聚乙二醇复合物(平均相对分子质量约为15 000)。一个由二环氧连接的聚乙二醇高相对分子质量复合物, 可以从色谱试剂供应商购买到聚乙二醇复合物 20M, 或 Carbowax 20M
G17 75%苯基-25%甲基聚硅氧烷
G18 聚烯烃乙二醇
G19 25%苯基-25%氰丙基-50%甲基硅酮
G20 聚乙二醇(平均相对分子质量 380~420)
G21 2, 2-二甲基丙二醇丁二酸酯
G22 双(2-乙基己基)邻苯二甲酸酯
G23 聚己二酸乙二醇酯
G24 二异癸基邻苯二甲酸酯
G25 聚乙二醇复合物 TPA。高相对分子质量聚乙二醇复合物和对苯二甲酸酯化的二环氧化物, 可以从色谱试剂供应商购买到 Carbowax 20M-TPA
G26 25%2-氰乙基-75%甲基聚硅氧烷
G27 5%苯基-95%甲基聚硅氧烷
G28 25%苯基-75%甲基聚硅氧烷
G29 3-3'-硫代二丙腈
G30 四乙二醇二甲醚
G31 壬基氧基聚乙二醇(平均乙氧基链长为 30); Nonoxymol30
G32 20%苯甲基-80%二甲基聚硅氧烷
G33 20%碳硼-80%甲基硅酮
G34 对磷酸稳定的二甘醇琥珀酸聚酯
G35 聚乙二醇和硝酸对苯二甲酸酯化的二环氧化物的高分子

复合物

- G36 1%乙烯-5%苯甲基聚硅氧烷
G37 聚酰亚胺
G38 包含少量拖尾抑制剂的 G1 固定相(Supelco 公司的 SP2100/0.1%Carbowax 1500)
G39 聚乙二醇(平均相对分子质量为 1500)
G40 乙二醇乙二酸酯
G41 苯甲基二甲基硅烷(10%苯基-取代)
G42 35%苯基-65%二甲基聚硅氧烷(百分率指摩尔取代)
G43 6%氰丙基苯基-94%二甲基聚硅氧烷(摩尔取代百分比)
G44 2%低分子量碳氢化合物油脂和 1%氢氧化钾溶液
G45 苯二乙烯-乙二醇-二甲基丙烯酸酯
G46 14%氰丙基苯酚-86%甲基聚硅氧烷

USP 24 NF-19 2000 的担体^[21](注意: 除非另有指定, 一般为 80~100 目或 100~120 目)

- S1A 气相色谱法所用的硅藻土, 用硅藻土和 Na₂CO₃ 混合物在 900℃以上焙烧。酸洗硅藻土, 然后水洗至中性, 但是不需碱洗。硅藻土可以用试剂如二甲基二氯硅烷处理使其硅烷化(除非在个论中另有指定, 一般用硅烷化担体)以屏蔽表面的硅烷醇基
S1AB 上述的硅藻土都要进行酸和碱洗(除非在个论中另有指定, 一般用硅烷化载体)
S1C 粉碎的耐火砖制备的担体用黏土黏合剂在 900℃以上焙烧, 随后酸洗。它可以是硅烷化的
S1NS 未处理的硅藻土
S2 具有小于 50m²/g 的标示表面积和平均孔直径为 0.3~0.4μm 的苯乙烯-苯二乙烯共聚物
S3 具有 500~600m²/g 的标示表面积和平均孔直径为 0.0075μm 的乙基苯乙烯和二乙烯苯共聚物
S4 具有芳香-O 和-N 基团、标示表面积为 400~600m²/g 和平均孔直径为 0.0075μm 的苯乙烯-二乙烯苯共聚物
S5 40~60 目、高相对分子质量的聚四氟乙烯
S6 具有 250~350m²/g 标示表面积和平均孔直径为 0.0091μm 的苯乙烯-苯二乙烯共聚物
S7 具有 12m²/g 标示表面积的石墨碳
S8 4-乙烯-吡啶和苯乙烯-二乙烯苯共聚物
S9 主要成分为 2, 6-二苯基-p-亚苯基氧化物的多孔聚合物
S10 强极性的丙烯腈-苯二乙烯交联共聚物
S11 少量凡士林和聚乙二醇复合物修饰的标示表面积为 9m²/g 的石墨碳(可从 Supelco 公司购得 Carbopack B 中的 SP1500)
S12 具有 100m²/g 标示表面积的石墨碳。

2. 生物样品

显而易见, 填充柱主要用于各种法定试验, 而利用毛细管柱测定生物液中的治疗药物已经越来越多地被人们所采纳。毛细管柱具有较高的分离能力, 通常能够解决由生物样品本身产生的干扰问题, 结合其专属性和灵敏度, 使生物液中许多以前无法测定的药物的定量分析变成可能。特别值得注意的是, 具有极低紫外摩尔吸收率的药物, 以

及那些从生物液中提取出来时, 因自身物理化学性质导致回收率极低的药物, 已经成功地应用毛细管柱 GC 法进行测定。

文献资料中到处可见这样的例子, 并且以不断增长的速度继续增加。本章的几篇参考书中也引用了这些实例^[3,81,82], 除此之外, 读者可以查阅一些期刊, 这些杂志经常发表采用 GC 法测定生物液中药物的文章。这些杂志包括: *Chromatographia*、*International Journal of Phar-*

maceutics、*Journal of Chromatographic Sciences*、*Journal of Chromatography-Biomedical Applications*、*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*、*Journal of Pharmaceutical Sciences*、*Pharmaceutical Research*、*Therapeutic Drug Monitoring* 和 LC-GC。

未来趋势

尽管人们经常会认为在药物分析中, HPLC 法的引入最终将取代 GC 法, 但是通过查阅现在的文献和最新药典, 明确表明 GC 法是“在此不动的”。那些 GC 法即将让位的观点在技术创新和应用的不断发展面前显得不切实际。其他用于药物分析的创新性定量技术也正进入人们的视野, 特别是高压毛细管电泳技术。这些更新的方法, 与目前已成熟使用的 TLC 法和 HPLC 法相结合, 毫无疑问将更大程度提高其重要性, 在将来会得到广泛应用。然而, 所有这些技术都不可能取代 GC 法, 因为每种方法都有自身的优势和劣势, 在药物分析中形成一个群体, 发挥各自的作用。

弹性熔融石英 WCOT 柱具有高分离性能, 其制造工艺的进步将推动 GC 法的应用, 而复杂的微机化检测器的出现, 则预示着灵敏度和专属性的提高。用于对映异构体分离的手性固定相正逐渐成为药物分析中的一个重要主题。用于手性 GC 分析的各种液相的选择范围和适应性的跃进, 必然使这项技术对于原料药的含量测定以及生物液中的应用非常有价值。

多维和多重联用技术日益增加, 特别对于生物液中的药物分析, LC-GC 联用大大解决了样品清洁和制备时间等问题^[84, 85]。GC-MS 联用继续成倍增加, 包括定性结构鉴别, 采用 SIM 进行定量分析^[86]以及 GC 法的其他定量应用(特别是三重四级杆 MS/MS 使用的增加)。

因此, GC 法显然已成为进行药物定性分析, 特别是定量测定中极具价值的一项技术。GC 法的应用包括检测杂质、挥发性物质、中间体和药物原料和制剂中有关物质, 这使其成为目前选用的一种方法。同时, GC 法在生物液中某些难以测定药物和代谢物的定量测定的应用也日益增加, 这表明 GC 法将来仍是这个领域的重要工具之一。

附录

《英国药典》(BP) 和《欧洲药典》(EP) 中 GC 法含量测定应用: 色谱纯度; 鉴别; 挥发性物质、中间体和有关物质的检查; 有机挥发性杂质; 水分测定; 异构体和外消旋体比例的测定; 乙醇量检查以及药物原料和制剂中 GC 的其他使用。

参考文献

1. Tswett, M.; Ber. Dtsch. Bot. Ges. 1906, 24, 316.
2. Martin, A. J. P.; Synge, R. L. M. A New Form of Chromatogram Employing Two Liquid Phases. 1. A Theory of

Chromatography. 2. Application to the Micro-Determination of the Higher Monoamino-Acids in Proteins. *Biochem. J.* 1941, 35, 1358.

3. James, A. T.; Martin, A. J. P. Gas-Liquid Partition Chromatography: The Separation and Micro-Estimation of Volatile Fatty Acids from Formic Acid to Dodecanoic Acid. *Biochem. J.* 1952, 50, 679.
4. Prior, F. Doctoral Thesis, University of Innsbruck, 1947.
5. Cremer, E.; Prior, F. Z.; *Electrochem.* 1951, 55, 66.
6. Ettre, L. S. Early Evolution of Gas Chromatography and Gas Chromatographic Instrumentation. *LC-GC* 1990, 8, 716.
7. Dimick, K. P. The Emergence of a Commercial Gas Chromatograph. *LC-GC* 1990, 8, 782.
8. McWilliam, I. G.; Dewar, R. D. Flame Ionization Detector for Gas Chromatography. *Nature* 1958, 181, 760.
9. Harley, J.; Nel, W.; Pretorius, V. Flame Ionization Detector for Gas Chromatography. *Nature* 1958, 181, 177.
10. Golay, M. J. E. *Gas Chromatography*; Desty, D. H., Ed.; Butterworths: London, 1958; 36.
11. Perry, J. A. *Introduction to Analytical Gas Chromatography*; Chapter 13 Marcel Dekker, Inc.; New York, 1981.
12. Kovats, E. Z.; *Analyt. Chem.* 1961, 181, 351.
13. Ardrey, R. E.; Moffat, A. C. Gas-liquid Chromatographic Retention Indices of 1318 Substances of Toxicological Interest on SE-30 or OV-1 Stationary Phase. *J. Chromatogr.* 1981, 220, 195.
14. In Clarke's *Isolation and Identification of Drugs*; The Pharmaceutical Press: London, 1986; 193-1112.
15. Leathard, D. A.; Schurlock, B. C. *Identification Techniques in Gas Chromatography*; Wiley: New York, 1970.
16. Leathard, D. A. *Advances in Chromatography*; Giddings, J. C., Grushka, E., Keller, R. A., Cazes, J., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1975; 13, 265.
17. Finkle, B.; Cherry, E. J.; Taylor, D. M. A GLC Based System for the Detection of Poisons, Drugs and Human Metabolites Encountered in Forensic Toxicology. *J. Chromatogr. Sci.* 1971, 9, 393.
18. The United States Pharmacopeia; United States Pharmacopeial Convention, Inc.; Rockville, MD, 1960.
19. The British Pharmacopoeia. The Pharmaceutical Press; London, 1968; 1268.
20. Ahuja, S. *Impurities Evaluation of Pharmaceuticals*; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1998.
21. The United States Pharmacopeia/National Formulary (USP 24-NF 19); United States Pharmacopeial Convention Inc.; Rockville, MD, 2000.
22. The British Pharmacopoeia (1999) incorporating the 3rd



- edition of the European Pharmacopoeia (1997); The Stationery Office; London, 1999.
23. Pollack, G. M. Chromatographic Analysis. In Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1989; 2, 419.
24. Jönsson, J. A. Chromatographic Theory and Basic Principles. Chromatographic Science Series; Jönsson, J. A., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987; 38, 27.
25. Van Deemter, J. J.; Zuiderweg, F. J.; Klinkenberg, A. Longitudinal Diffusion and Resistance to Mass Transfer as Causes of Non-Ideality in Chromatography. *Chem. Eng. Sci.* 1956, 5, 271.
26. Souter, R. W. Modern Methods of Pharmaceutical Analysis. Schirmer, R. E., Ed.; CRC Press Inc.: Boca Raton Florida, 1982; III, 5.
27. Giddings, J. C. The Random Downstream Migration of Molecules in Chromatography. *J. Chem. Ed.* 1958, 35, 588.
28. Giddings, J. C. Dynamics of Chromatography, Principles and Theory; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1965.
29. Kline, B. J.; Soine, W. H. Pharmaceutical Analysis, Modern Methods; Munson, J. W., Ed.; Chapter I Marcel Dekker, Inc.: New York, 1981.
30. Perretta, A. T.; *Am. Lab.* 1976, 35, 6.
31. Prescott, B. O.; Wise, H. L. Clean Gases for Gas Chromatography. *J. Gas. Chromatogr.* 1966, 4, 80.
32. A User's Guide to Chromatography; Regis Chemical Co.; Morton Grov, IL, 1976; 23.
33. Grant, D. W.; Clarke, A. A Study of the Effects of Instrument Variables on Accuracy and Precision in Gas Chromatography. II. Errors Associated with the Injection of Liquid Samples by Microlitre Syringes. *J. Chromatogr.* 1974, 97, 115.
34. Cramers, C. A.; McNair, H. M. Chromatography. Part A. Fundamentals and Techniques; Heftmann, E., Ed.; Journal of Chromatography Library; Elsevier Scientific Publishing Company: Amsterdam, 1983; 22A, A203.
35. Jennings, W. Gas Chromatography with Glass Capillary Columns; Academic Press; New York, 1980; 53.
36. Freeman, R. P. High Resolution Gas Chromatography; Hewlett Packard; California, 1979; 47.
37. Harris, W. E. Some Aspects of Injection of Large Samples in Gas Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 1973, 11, 184.
38. Grob, K.; Grob, K., Jr. Isothermal Analysis on Capillary Columns without Stream Splitting: The Role of the Solvent. *J. Chromatogr.* 1974, 94, 53.
39. Schomburg, G.; Diehlmann, R.; Husmann, H.; Weeke, F. New Developments with Glass Capillary Column Production and Sampling Techniques. *Chromatographia* 1977, 10, 580.
40. Grob, K.; Grob, K., Jr. On-Column Injection onto Glass Capillary Columns. *J. Chromatogr.* 1978, 151, 311.
41. Grob, K.; HRC & CC. 1978, 1, 263.
42. Galli, M.; Trestianu, S.; Grob, K., Jr. HRC & CC. 1979, 2, 366.
43. David, D. J. Gas Chromatographic Detectors; Wiley-Interscience; New York, 1974.
44. Adlard, E. R. A Review of Detectors for Gas Chromatography. Part 1: Universal Detectors. Part 2: Selective Detectors. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1975, 5, 1.
45. Grob, R. L., Ed.; Modern Practice of Gas Chromatography; John Wiley & Sons; New York, 1985.
46. Clement, R. E.; Onuska, F. I.; Eiceman, G. A.; Hill, H. H., Jr. Gas Chromatography. *Anal. Chem.* 1990, 62, 414R.
47. Both, D. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals; Adamovics, J. A., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1990; 49, 119.
48. Elvidge, D. A.; Proctor, K. A. The Use of Gas Chromatography for Determining Water in Pharmaceutical Preparations. *The Analyst* 1959, 84, 463.
49. Zlatkis, A.; Poole, C. Derivatization Techniques for the Electron-Capture Detector. *Anal. Chem.* 1980, 52, 1002a.
50. Paterson, P. Recent Advances in Thermionic Ionization Detection for Gas Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 1986, 24, 41.
51. Driscoll, J. Review of Photoionization Detection in Gas Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 1985, 23, 488.
52. Farwell, S.; Barinaga, C. Sulfur-Selective Detection with the FPD: Current Enigmas, Practical Usage and Future Directions. *J. Chromatogr. Sci.* 1986, 24, 483.
53. Anderson, R. J.; Hall, R. C. Chromatography; International Scientific Communications Inc., 1981; 1, 64.
54. Nyarady, S. A.; Barkley, R. M.; Sievers, R. E. Redox Chemiluminescence Detector: Application to Gas Chromatography. *Anal. Chem.* 1985, 57, 2074.
55. Hutte, R.; Sievers, R.; et al. Gas Chromatography Detectors Based on Chemiluminescence. *J. Chromatogr. Sci.* 1986, 24, 499.
56. Andrawes, F.; Ramsey, R. The Helium Ionization Detector. *J. Chromatogr. Sci.* 1986, 24, 513.
57. Grayson, M. The Mass Spectrometer as a Detector for Gas Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 1986, 24, 529.

58. Biemann, K. The Mass Spectrometer as a Detector in Chromatography. *J. Chromatogr. Libr.* 1985, 32, 43.
59. Evershed, R. P. Analysis of Mixtures by Mass Spectrometry. Part I. Development and New Applications of Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Mass. Spectrom.* 1987, 9, 196.
60. McMaster, M.; McMaster, L. *GC/MS: A Practical Users' Guide*; Wiley-VCH: New York, 1998.
61. Smith, S.; Adams, G. Chromatographic Performance and Capillary Gas Chromatography: Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Chromatogr.* 1983, 279, 1358.
62. Demirjian, J. C. Gas Chromatography: Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Component Identification in Complex Organic Mixtures. *Trends Anal. Chem.* 1987, 6, 58.
63. Cone, E. J. *Pharmaceutical Analysis, Modern Methods*; Munson, J. W., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1981; 143.
64. Coldwell, R. D.; Porteous, C. E.; Trafford, D. J. H.; Makin, H. L. J. Gas Chromatography-Mass Spectrometry and the Measurement of Vitamin D Metabolites in Human Serum or Plasma. *Steroids* 1987, 49, 155.
65. Supina, W. R. The Packed Column in Gas Chromatography; Supelco, Inc., 1974; 106.
66. ChiralDEX Capillary GC Columns; A Guide to Using Cyclodextrin Bonded Phases for Gas Chromatography; Advanced Separation Technologies, Inc., 1990.
67. Baulescu, G. E.; Illie, V. A. Stationary Phases in Gas Chromatography; Chapter 4 Pergamon Press; Oxford, 1975.
68. Dal Norgare, S.; Juvet, R. S. *Gas-Liquid Chromatography*; Wiley-Interscience; New York, 1962; 63.
69. Martin, A. J.; Bennett, C. E.; Martinez, F. W., Jr. *Gas Chromatography*; Noebels, H. J., Wall, R. F., Brenner, N. Eds.; Academic Press; New York, 1961; 363.
70. Griffiths, J. H.; James, D. H.; Phillips, C. S. G. Section 8. Adsorption and Partition Methods. *Gas Chromatography. The Analyst* 1952, 77, 897.
71. Blau, K.; King, G. S. *Handbook of Derivatives for Chromatography*; Heyden and Sons, 1977.
72. Knapp, D. R. *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*; Wiley-Interscience; New York, 1979.
73. Ahuja, S. Derivatization in Gas Chromatography. *J. Pharm. Sci.* 1976, 65, 163.
74. Nicholson, J. D. Derivative Formation in Quantitative Gas-Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals. Part II, A Review. *The Analyst* 1978, 103, 193.
75. Bailey, L. C. *Remington's Pharmaceutical Sciences*; Mack Publishing Company, 1985; 17, 603.
76. Barnes, R. L. *Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals*; Adamovics, J. A., Ed.; Chapter 6 Marcel Dekker, Inc.; New York, 1990; 49.
77. McClure, G. L. Improved Determination of Organic Volatile Impurities in Pharmaceutical Materials by, 〈USP-467〉 Using Automated Static Headspace GC/MS. *PDA J. Pharm. Sci. Tech.* 1999, 53, 129.
78. Paul, L. Personal Communication, Associate Director, General Policies, Nomenclature and Labeling Division; United States Pharmacopoeia; Rockville, MD, 2000.
79. Hinshaw, J. V. Headspace Sampling. *LC-GC* 1990, 8, 362.
80. Jack, D. B. *Drug Analysis by Gas Chromatography*; Academic Press; New York, 1984.
81. Tsuji, K. *GLC and HPLC Determination of Therapeutic Agents*; Tsuji, K., Morozowich, W., Tsuji, K., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1979; 9.
82. Adamovics, J. A. Ed.; *Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals*; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1990; 49, 225.
83. Schirmer, R. E. Ed. *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*; CRC Press Inc.; Boca Raton Florida, 1990; II, 227.
84. Grob, K. On-line Coupled High-Performance Liquid Chromatography; *Gas Chromatography. Trends Anal. Chem.* 1989, 8, 162.
85. Riekkola, M. L. Applications of On-line Coupled Liquid Chromatography; *Gas Chromatography. J. Chromatogr.* 1989, 315, 473.
86. Cone, E. J. *Pharmaceutical Analysis, Modern Methods*; Munson, J. W., Ed.; Chapter 3 Marcel Dekker, Inc.: New York, 1981.

(陈 阳 金玉琼 译)



S

伤口包扎敷料

Sarah M. E. Cockbill

University of Wales, Cardiff, United Kingdom

引言

历史上,人们曾使用多种多样来源于动物、植物或矿物的材料来处理伤口,如 Ebers 莎草纸中介绍的热油、蜡^[1],中世纪的动物膜和粪便,19 世纪采掘的麻絮丝等。在公元前 2100 年,闪族人的碑刻上还提到了潮湿的泥敷剂^[1,2]。中世纪的诊疗手稿中用图演示了湿润环境和生物学“治疗”的例子,如用狗舔伤口,特别是手术后的伤口,以润湿、清洁伤口或促进愈合。这是基于现代的认识,当时还不知道唾液中存在抑菌剂和生长因子^[3]。“创伤处理之父”Ambroise Paré (1510~1590 年),在 16 世纪使用了一种半密封、油浸渍的敷料以获得如组织般柔软的感觉^[4]。Galen (130~201 年)最早描述了一种油酸铅硬膏,该硬膏中含有用亚麻子和药蜀葵制成的黏稠且湿润的基质。1819 年,Abraham Rees 强调了预防疤痕形成的必要性,利用油浸渍纱布的保湿和防黏作用将伤口边缘分离,可预防疤痕形成^[5]。19 世纪,人们在伤口上使用湿敷布或高岭土泥敷剂,再覆盖防水纤维,如防水油布、蜡染布或油绸来进行保湿。20 世纪出现了软石蜡浸渍的纱罗织法纱布,即丝网眼纱。

早先的伦敦和爱丁堡的医院处方集与后来的英国药品法典均收录了第一个权威性的有关伤口敷料的专论。从这些法典和英国药典中可以找到伤口包扎材料的发展历程^[6]。美国药典和其他国家标准的类似出版物也反映了这个历程。

1960 年前,创伤敷料的设计和功能的发 展是间歇性的,受限于当时能使用的材料。在那之前,产品主要是各种填塞和覆盖材料,如亚麻布、纱布、棉花、羊毛和麻绳等,均为被动式的产品,并不能促进伤口的愈合。

随着对伤口愈合过程中体液和细胞因子作用认识的提高,以及意识到为了促进伤口愈合控制微环境的必要性,新一代产品摒弃了传统的“全覆盖”敷料的理念。这类环境控制敷料可以认为是交互式的。

优化通过创伤微环境伤口愈合过程中的非细胞和细胞活动,这种微环境将允许细胞的自由运动和对生物活性物质产生有效响应。当温度和湿度等环境因素达到皮下水平时,就会有最佳的响应。

性能指标

George Winter 于 1962 年在《自然》杂志上发表的广为引用的论文中^[7],提出了湿润伤口愈合的概念,虽然

Bull 等在 1948 年^[8]公开的研究结果表明覆盖“薄膜”会促进伤口愈合。

1979 年,Turner^[9,10]制定了能成功形成可接受微环境的创伤敷料产品的性能指标,具体内容如下:

- 在创伤/敷料界面维持高湿度;
- 能排出过量的渗出液和有毒成分;
- 允许气体交换;
- 能隔热;
- 能保护伤口免受二次感染;
- 无粒子和有毒污染物;
- 在更换敷料时不会引起创伤。

这些标准现在仍然有效。随着人们对参与伤口愈合的生长因子了解的增多,增加的一项要求是:

- 敷料应不影响参与伤口愈合的体液和细胞因子的功能。

1. 湿度水平和渗出液的排出

将伤口部分或完全暴露于空气中会使其温度要比环境温度低,由于组织液的蒸发损失了潜热。凝结和纤维化过程会形成一个封闭的干痂,有效封闭和隔离伤口,从而限制水分和气体的穿透,阻止上皮细胞向湿润的痂下组织迁移。其结果是愈合过程缓慢,伤口污染和感染的危险性增加;同时,由于封闭伤口被切断供给,腔内肉芽形成不完全,会引起疤痕形成过度。在创伤和敷料之间保持高湿度,能促进表皮迅速愈合。

吸收掉过多的渗出液不仅能避免组织被浸软,还能排出外毒素和细胞碎片。这些外毒素和细胞碎片能够延迟生长或延长伤口愈合过程的炎症期。湿度和吸收的平衡是非常关键的,同时必须避免过度的灯芯效应,以防出现干燥和坏死。

2. 换气

气体通透性允许水汽透过,对于高渗出性创伤,如烧伤、骶部和腿部的高渗出性溃疡特别重要。换气对于氧气(p_{O_2})和氢离子浓度(pH)同样重要。大气中的氧能极大地促进创伤上皮的形成,氧溶解于浆液性渗出物中,通过血红蛋白补充向伤口表面转运的氧,随后被迁移的表皮细胞直接利用。

3. 隔热

隔热有助于将伤口温度尽可能维持在体温水平,低于 28℃ 的温度将对吞噬细胞和有丝分裂活性产生很大影响。要维持理想的愈合速度,热绝缘和“温暖的”换药环境至

关重要。将湿创口暴露过长时间会降低表面温度,引起有丝分裂活动停止,而且该组织的恢复要等 3h。在好的隔热敷料下,温度会达到 30℃ 以上,从而增加了有丝分裂活性,加快了上皮形成并改善肉芽生成^[11]。

4. 阻隔微生物

阻隔细菌有双重作用:一是伤口如果严重感染将不能愈合,同时炎症期将延长;二是要使用局部或全身的抗生素,否则会引起全身感染。然而,大多数创口能容忍少量的微生物,吞噬活动的破坏或净化期会产生一个自我灭菌的环境,这样伤口会免于微生物的再次感染,或者如果仍受到污染,可以防止感染性微生物的传递。

因此,包扎敷料应该能阻止空气中传播的微生物的穿透。这些微生物可能落在敷料表面,穿透敷料而感染伤口。它也应能阻止伤口微生物穿出敷料通过空气传播,从而引起交叉感染。微生物传播大多发生于被创伤表面的渗出液浸透的敷料中,这类敷料能提供进出创伤表面的湿润通道。

从渗出液浸透敷料开始,只要短短 6h 微生物就能穿过创伤表面。

5. 避免粒子和有毒的伤口污染物

粒子和可能污染伤口的有毒物质均会干扰愈合模式。纤维性粒子进入伤口会导致肉芽肿,从而降低伤口强度,引起瘢痕瘤。已有充分的文献证明,粒子污染会降低感染抵抗力达 1.0×10^{-6} 倍。

6. 换敷料过程中的损伤

最佳的伤口环境可以用性能参数优良的敷料产品维持,但是在换敷料时会受到干扰。由于包扎敷料粘连伤口,除去敷料时会撕裂刚刚形成的组织,从而引起二次创伤。二次创伤伴随有温度变化和再次感染的危险。

粘连通常是由于干渗出液的黏着性引起的,并且在换敷料时,对穿入敷料材料的毛细血管袢的破坏还会加重创伤(图 1)。

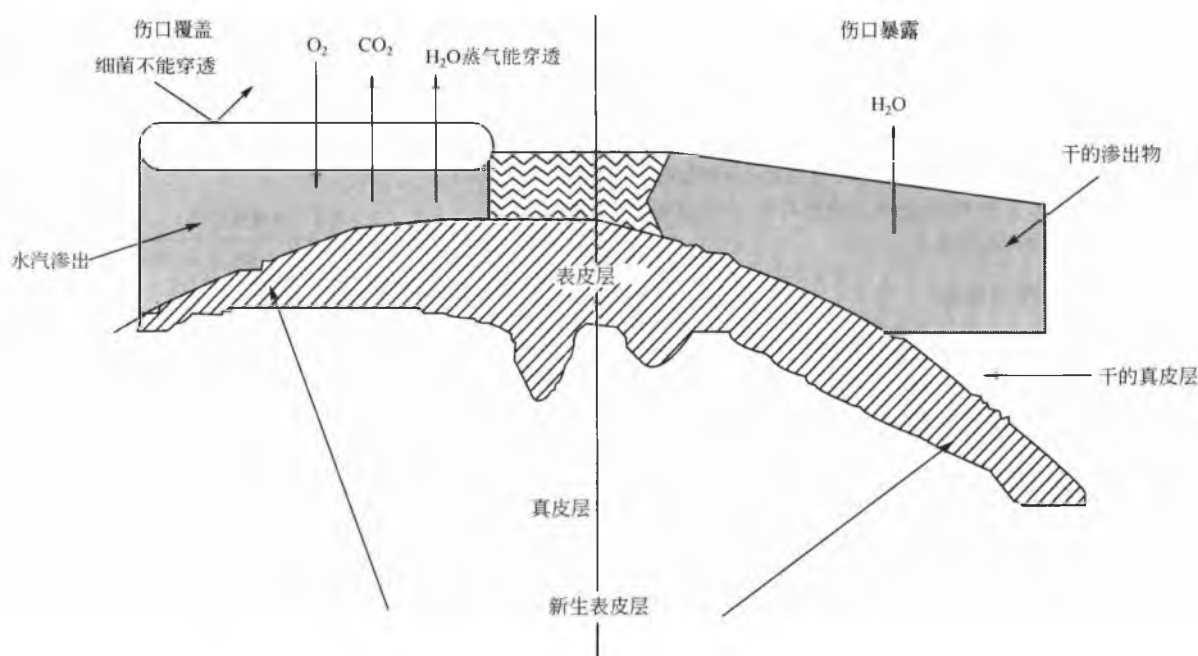


图 1 可控微环境的伤口愈合反应

在包扎操作中要考虑一些物理特性,虽然这些特性与形成合适的微环境没有直接联系。包扎敷料应该具有如下特性^[10]:

- 与创口相应的面积;
- 与从干的到严重渗出液创口相应的吸收能力;
- 对于干创口和湿创口均要有良好的相容性和易于处理;
- 无菌,储存时稳定;
- 丢弃方便。

这些参数鼓励人们利用材料技术方面的进展开发出功能性的产品。随着合成高分子材料的发展,又有新产品紧跟其后出现。所要求的性能指标可作为高分子材料产品的规格。

作为外科敷料的高分子材料产品已包括如下几种:

- 透气膜;
- 聚合物泡沫;
- 粒子性和纤维性聚合物;
- 干凝胶和水凝胶;

S

- 水性胶体等。

这些材料标志了在生产理想的伤口敷料方面的进步。可是应该强调,没有一种单独材料能为所有的创口或同一伤口的各个愈合阶段创造最佳的微环境。因此,应该对伤口进行确诊,在愈合过程的不同阶段采用最合适的包扎材料。

本章将介绍目前可用的敷料,说明其主要的化学和物理特性,并简述其推荐的临床用法。

吸收剂

外科吸收剂的功能是不言而喻的^[9,12]。吸收剂有如下多种形式:

- 纤维性(化学短纤维)吸收剂;
- 织物吸收剂;
- 纤维和织物混合吸收剂;
- 伤口敷垫。

1. 纤维性吸收剂

这些吸收剂由棉纤维或纤维黏胶或纤维素制成,纤维黏胶和棉可以混合使用。

1.1 脱脂棉吸收剂

脱脂棉的品质随着棉纤维的长度和直径的不同而不同,以卷或球的形式用于清洁抹擦创口,处理外科手术前的皮肤,或者将外用药物涂在皮肤上。

1.2 纤维黏胶吸收剂

纤维黏胶吸收剂的吸收性能和物理特性会因制造过程而有显著的改变,有亮或暗的两种形式。后者在纤维之中含有特殊材料,如二氧化钛。通常,这种纤维是一种连续性长纤维,具有圆锯齿形分割为各个小部分的剖面,但可获得光滑和发光的形式,能表现出各种程度的吸收能力和湿张力。

有一些纤维吸收剂含有一定比例的丙烯酰胺或其他合成聚合物纤维,能提高吸收性能,并可作为羊毛织物的支架,从而改善了液体的滞留和避免了羊毛织物吸湿后压缩而将液体挤出。

1.3 纤维素填絮

纤维素填絮是用脱木素木浆制成,为多层的复合材料,大片用于吸收失禁后的大量液体,但不用于伤口,除非外面包裹织物套,以防纤维留在伤口上。

2. 织物吸收剂

2.1 医用绒布

医用绒布为密织棉布,在一面拉毛,当拉毛面朝上置于渗出性伤口时,能提供较大的蒸发表面积。在现代伤口

处理中不太受欢迎。

2.2 吸水纱布

吸水纱布是应用最广泛的吸收剂,为漂白的平纹编织棉布,很干净,无织疵,无棉花叶片、种皮的残留^[6]。灭菌后呈米色,容易吸水,但延期储存或加热后其性能下降。

纱布是外科手术前、手术中和手术后使用的主要吸收剂,但是在手术中还要用作其他用途,如覆盖不进行手术的部位以保护组织和器官,加湿热以便可疑组织的保持活力,沿切开线钝性分离筋膜以避免不必要的切割^[13]。

纱布还可含有一定比例的纤维黏胶,掺入到经纱和纬纱中,或者只掺在纬纱中。最多可含45%的纤维黏胶。按每10cm宽的纱布含经线的数量将纱布分级。

纱布产品可分为两大类:一类是将布折叠和缝合制成的药签或海绵型;另一类是平布型。药签型包括药签、创可贴、衬垫和脱脂棉。平布型包括包裹和丝带。药签或海绵纱布可在市场上买到,折叠成长方形或正方形,有不同的尺寸和厚度。折叠时要将割边折得看不见,可以将割边缝合。手术室用的纱布可含有或不含有射线(X射线)阻隔层,将含有硫酸钡的单股或多股的线织入或通过加热粘在织物上形成阻隔层。商品尺寸从5cm×5cm到10cm×15cm,层数从4~32层。有一些还用牢固无毒的染料进行染色(表1)。

表1 吸收性纱布

类型	每10cm支数		
	经线	纬线	克重/(g/cm ²)
13轻	73	57	14
13重	70	60	17
17	100	70	23
18	100	80	24
20	120	80	27
22	120	100	30
24a	120	120	32
24b	140	100	32

2.3 麦斯林纱

脱脂麦斯林纱为漂白的稀疏编织的棉布,不常用于处理大面积烧伤和用作湿敷料。

3. 无纺织物

无纺织物有各种各样的产品,由合成或半合成纤维制成。

3.1 无纺药签

无纺药签由无纺纤维黏胶制成,折叠成不同尺寸。它

的总吸收容量要比纱布低,但由于胶黏纤维随机排列,吸收较快。作为织物,它们用于许多伤口敷料衬垫的外层,有时涂有高分子材料以减少换敷料时的粘连。

表1列出的种类源自欧洲药典,指定类型编号为总经、纬线数的1/10。

3.2 纤维海绵

纤维海绵为空隙泡沫纤维性海绵,有片状和细条状。在外科手术中用于小部位的吸收。该材料不阻隔射线,可能会发生掉粒,因此必须谨慎用于外科手术。

3.3 神经小馅饼

神经小馅饼为无纺吸收性纤维黏胶制成的小方块或条状,用缝合线穿过无纺布织物缝合,并留下线头。在神经外科中用作定位吸收剂。使用前将其在生理盐水中浸湿。线头留在手术区域外面,手术完成后,提住线头就能方便地取出。有不同大小和形状的产品,还有一种系上所有线头的装置,从而形成迷你的计数齿条。

4. 纤维和织物吸收剂

4.1 纤维素棉纱垫

纤维素棉纱垫由厚层纤维素填料包上管状纱布组成。单独两种材料的性质已经描述过了。纤维素棉纱垫用作吸收剂和保护垫。只有在伤口和衬垫之间放置一层非粘连层时,才能用作伤口敷料。这种材料吸收性强,由于它很厚,还具有绝缘特性,能提高皮肤的表面温度,从而加速伤口的愈合。在高渗出表面,纤维素填充敷料可能会坍塌,成为半固体的湿块,在实际操作中会引发困难。

4.2 纱布和棉敷料

纱布和棉敷料是将厚层的脱脂棉填充入管状的纱布中制成的,用途与纤维素棉纱垫相同。但其优点是吸收容量高,湿坍塌较少。由于其使用时更柔软,因而更适合伤口表面。在高渗出的表面,如烧伤,可用它代替纤维素棉纱垫。但如前所述,纤维素棉纱垫不能直接接触伤口表面,应将其置于非粘连的第一层包扎材料之上。

伤口敷料衬垫

伤口敷料衬垫使用广泛,有多种配方,包括前述的纤维和织物吸收剂及组合其他材料以满足特定的性能要求,衬垫可以细分为以下种类:

- 吸收剂和薄膜产品;
- 单层核心的套筒衬垫;
- 多层核心的套筒衬垫;
- 低黏附衬垫。

吸收剂和薄膜产品已经描述过了。最简单的套筒衬垫含有棉花、纤维黏胶或纤维素纤维,外套为纱布或无纺布材

料。多层核心衬垫的外套为聚合物,如用聚丙烯处理过的棉花、纤维黏胶或无纺布,以减少黏附。多层核心的目的是增大吸收容量,延长使用时间,推迟渗到外层表面的时间。在外层材料内使用液体滞留层,使液体在衬垫内水平移动,可以达到上述目的。

1. 低黏附衬垫

低黏附衬垫具有低黏附性的伤口接触面,材料可以是铝涂布的织物、微孔聚合物薄膜或热粘接聚乙烯薄膜等。伤口接触薄膜可以附着于吸收性纤维底板和外层的织布或无纺布上。有些产品中聚合物薄膜在敷料两面形成连续的涂层。其主要用于低渗出液的和干的伤口,这种伤口容易发生粘连。有时将这些低粘连、低吸收容量的敷料置于黏性背衬材料中心形成岛状敷料,作为手术后的胶黏性敷料,或者更为熟悉的用于浅表性损伤的急救岛状敷料或绷带。

2. 低粘连第一层包扎敷料

低粘连的第一层包扎敷料由部分开口的池结构的尼龙或纤维黏胶织物组成,可能还有硅酮涂层。开口的池结构允许液体传送至上层的吸收性敷料衬垫。在必要时可更换衬垫而不至于影响下层的接触层。

3. 去臭敷料

去臭敷料含有吸附气体能力很强的活性炭,可以是机织织物或纤维性底板,背衬为尼龙外层,作为透气薄膜或聚氨酯泡沫。各种配方的目标是降低气味,因此包扎材料应足够大,能覆盖整个有恶臭的区域。有一个产品将炭层直接与伤口渗出液接触,然而这样会限制其气体的吸附,据说将金属银加入炭层的布中能灭活吸附在织物表面的细菌,从而减轻感染程度,并减轻气味。

4. 聚合物敷料

4.1 透气薄膜

透气薄膜用于生成了肉芽组织且渗出液在减少的伤口^[14]。开发这些产品的目的是部分模拟皮肤的功能。最终的产品是透明合成的黏附性膜,通常称为透气性黏附膜。其含有透明的聚氨酯或其他低反射的合成膜,在膜的一侧均匀涂布上合成黏附性基质。胶黏剂有内聚性,接触水分后失去黏性,因而不会粘住湿皮肤或伤口。该膜能透水汽、氧气和二氧化碳,但不能透过水和细菌,具有很好的弹性和延长性。因而使用舒适,强度高,无菌,无粒子。

去除角质层会导致组织内的水分损失,24h内损失达3000~5000g/m²。这种损失引起具有重要临床意义的逐渐脱水,特别是三度烧伤的情况。24h内通过放置的透气膜损失的水分减至2500g/m²或更少,取决于膜的结构。这样有助于通过水蒸气跨膜渗透排除过多的液体,同时防止脱

水和保持伤口界面湿润。当渗出液的体积明显大于通过水蒸气清除的体积,膜的不渗水性会导致膜下出现严重的浆液性渗出物积聚。不透水性会阻止外源性的润湿。

湿润界面对于伤口愈合的重要性已获得公认。湿润的界面有助于新上皮迅速迁移至伤口表面,避免换敷料时由粘连引起的损伤,并有助于损害组织的气体扩散。氧气和二氧化碳通过分子间扩散穿过膜并溶解于伤口表面水分中。在室温下,膜的透氧性为 $4000 \sim 10\,000 \text{ cm}^3 / (\text{m}^2 / 24\text{h})$ 。伤口表面的 $p\text{O}_2$ 和 pH 浓度与透气性直接相关,从而有助于细胞活动。由于该膜不能透过细菌,如绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等微生物,还能保护伤口免于二次感染。

透气膜敷料可用于处理各种状况,如溃疡、烧伤、擦伤皮移植供体部位。磨去皮肤疤痕的手术首先应止血,将伤口边缘擦干后,再使用薄膜。用于处理烧伤时要预先仔细消毒。仅推荐其用于浅表性和临床上洁净的烧伤,不适用于深度烧伤,因其会延迟坏死组织的分离。

透气膜还可用于覆盖褥疮,因其还具有抗剪切力和低表面摩擦的优点,能保护表层免于物理摩擦,同时对正常皮肤功能影响最小。这种特性可以使该膜预防性地用于压伤而没有溃烂的部位。

这种膜还可用于病房和手术室固定导管。已有生产的新产品具有不同的水蒸气通透性,能减少膜下水分的滞留,从而降低感染的风险。

最近,加入抑菌剂(银)用于处理感染伤口,或者加去除异味剂(炭)用于恶臭的伤口的薄膜材料也已出现。

4.2 聚合物泡沫

聚合物泡沫敷料的种类很多,产品性质差异很大。最简单的是将发泡的聚合物制成片状。伤口接触层通常通过热处理加压形成亲水多孔的光滑的不粘连的表面,约 0.5mm 厚,表面通过毛细管作用吸收液体。该敷料的外表面为具有相对较大的小室的一层,约 5mm 厚,仍为疏水性。通过对泡沫进行物理调节或附加其他的材料,可以改变其吸收性和水蒸气穿透性。

聚合物发泡时会形成能容纳液体的开放式小室,在发泡过程中可以控制小室的大小。最常用的聚合物是聚氨酯,其结构和柔软性除了能起到保护垫作用外,还能保温伤口。经过剪裁还能用于特殊的用途,如用作气管造口术敷料,不会有粒子遗留在伤口上,同时还保留了舒适特性。不具黏附性的泡沫需要二次包扎。

这类敷料还可以原位形成泡沫,也可以是黏附性孤岛包扎材料和空腔填充剂^[14]。它们用于中等或严重渗出伤口的吸收性敷料。

严重渗出物的吸收限于伤口-敷料界面。在渗出液多的伤口应用时,会超过疏水性部分的吸收容量,此时尽管水汽可以透过敷料,仍需要频繁地更换敷料直到渗出液量减少。这种敷料将吸收性能和形成可接受微环境结合起来,使患者在完全的临床条件下以最快的速度愈合。

这种聚氨酯泡沫敷料推荐用于干燥的缝合伤口、小撕

裂伤口、早期的压迫性溃烂和静脉曲张性溃烂等^[15,16]。

人们开发了不同吸收能力的泡沫敷料专门用于溃疡和烧伤的处理。用于处理烧伤的敷料的主要功能是吸收,由高吸收性的亲水性聚氨酯泡沫组成,背衬材料为一层透气的聚氨酯膜,固定于伤口接触面的多孔聚氨酯网上。背衬能透过水蒸气,但不透水,因而避免了液体渗出。当渗出液量减少时,该膜能保湿,防止伤口干燥。多孔的聚氨酯网接触面减少了伤口表面的粘连^[17]。

低吸收容量的主要泡沫敷料可以用羧化的丁苯橡胶泡沫胶乳制成。泡沫与无纺织物黏合,该无纺织物涂有一层真空穿孔的聚乙烯膜。基层的泡沫本身是疏水性的,通过添加表面活性剂促进其吸收伤口渗出液。这种敷料推荐用于较小的创口和擦伤,这种伤口渗出液较少,在换药时粘连会对伤口造成较大的伤害。

4.3 原位泡沫

这种泡沫主要用于处理藏毛窦、化脓性汗腺炎、肛门周围和会阴伤口,以及处理裂开的腹部伤口。

此时必须填充封闭空腔以吸收过多的渗出液,并刺激肉芽组织生成、新生血管形成和胶原沉积。

原位形成泡沫最初由道康宁公司设计,发现其临床使用效果要优于纱布条^[18]。对其细胞毒性的认识还有争议,但已有产品上市,若不加以介绍将是本章的损失。

空腔泡沫敷料由两个部分组成:聚二甲基硅氧烷与引发剂辛酸亚锡。在使用前将两种组分混合。聚合反应轻微放热,在 2~3min 内完成,体积增大 4 倍,形成一种柔软的、像海绵那样的泡沫,形状精确契合伤口空腔轮廓。通常每日两次将固定模取出,浸在温和的杀菌剂(0.5%洗必泰水溶液)中,用冷的自来水漂洗,挤干,再放回去。一周后使用新的敷料以适应减少的空腔容积。该产品不黏附于肉芽组织。它保留了伤口周围的自然引流,敷料表面有着较低但显著的吸收容量。

4.4 氢化聚合物

氢化聚合物外观像泡沫,但被称为泡沫凝胶。当其吸收液体时,这种材料膨胀后契合伤口的轮廓,并带有独特的胶黏剂部分形成岛形结构。这种材料在揭开后还能粘上,方便了移动产品或观察伤口情况,而无须更换敷料。氢化聚合物将液体导入敷料上层,通过背衬除去^[19]。

4.5 水凝胶

水凝胶,又称为水合聚合物胶,是经过修饰的交联聚合物处方,能形成亲水聚合物的三维网状结构。亲水聚合物可由这些材料制成,如明胶、多糖、交联聚丙烯酰胺、聚电解质复合物,以及甲基丙烯酸酯的聚合物或共聚物等。这些材料与水溶液相互作用直到膨胀至平衡,并在其结构内保留了大量的水。其不溶于水,以干的或水化的膜,或水化的凝胶置于输送系统中单次使用。

本体聚合物的物理性质直接受很多因素的影响,包括



单体、共聚物、交联剂的性质和交联程度、聚合引发剂和工艺参数等。亲水和疏水中心的有效性受链的结构和构象的影响,决定了亲水程度和透氧性。通过改变聚合物骨架的性质,可以改变其与水结合的行为,从而获得不同的机械性质、表面性质和渗透性质。在用于人体之前,可以利用水凝胶结构的膨胀性和渗透性将聚合引发剂分子、引发剂分解产物和其他外源杂质从凝胶网状结构中提取出来。大多数水凝胶具有类似组织的结构,对周围细胞和组织的机械刺激很小,有着较好的生物相容性。水凝胶在水溶液中的界面自由能很小,不易于吸附生物成分,如蛋白质或细胞。其高含水量维持了想要的湿润界面,从而促进细胞迁移和防止敷料粘连。饱和水凝胶能传递水,而不饱和水凝胶具有与透气膜相当的透水蒸气性。

吸收性能、传递性能和渗透性能可以维持伤口的湿润,并有连续不断的湿气流通过敷料,解吸附梯度有助于从受伤区域除去有毒成分。高含水量有助于溶解氧的渗透,尽管不同产品之间有差异,但在伤口和敷料之间允许持续地供氧,能促进上皮形成和细菌滋长。有人注意到,使用水凝胶通常会显著减少患者的疼痛反应,推测可能是高湿保护暴露的神经细胞免于脱水,并产生了可接受的 pH 变化。第二个原因可能是凝胶能迅速冷却伤口表面,维持较低温度长达 6h^[20]。

4.6 水凝胶片

水凝胶片是交联亲水聚合物,如聚环氧乙烷、聚丙烯酰胺、聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素和改性玉米淀粉等的片状三维网状结构。处方能结合 96% 的水,但不溶于水,遇水膨胀形成三维结构。这类聚合物物理结合水后形成实心片,有热容量,最初对伤口表面有冷却作用。需要二次包扎。

这些产品推荐用于以下用途,包括:处理供体部位和浅表手术部位,治疗新鲜的慢性上皮损伤(如烫伤)及其他疼痛的创口,以及避免局部用药的真皮皮肤等。对于慢性溃疡,能促进肉芽形成和蜂窝组织的形成。

4.7 无定形水凝胶

无定形水凝胶除了水和聚合物外,还含有添加剂,如海藻酸盐、胶原或复合糖。其成分与水凝胶片相似,但聚合物没有交联。这些无定形制剂没有薄片敷料的冷却性质,还需要第二层敷料。推荐其用于干燥、坏死或坏疽创口的水化和自溶清创术。

一个主要的水凝胶敷料采用辐照交联聚环氧乙烷-水胶体混悬液制成,平衡时含水量达 96%。该凝胶夹于两层聚乙烯膜中间,用时除去伤口接触膜,外层膜用于控制凝胶表面的水分蒸发^[21,22]。Max Plank 免疫生物学和皮肤病学研究所开发了一种新型水凝胶,由不溶的交联聚丙烯酰胺琼脂糖聚合物组成,含有 95% 的水作为分散相^[23]。该凝胶以水合或无水颗粒形式提供,随着表面积的增加,能吸收更多的渗出液。颗粒可用于填充伤口空腔,并覆盖上水凝

胶片,形成连续的水凝胶敷料。

一种可以替代丙烯酸酯复合物的水凝胶敷料,是丙烯酸酯胺附于聚氨酯薄膜上形成透明、柔韧的凝胶,平衡含水量约 50%。这种水合凝胶弹性模量较低,水渗透性较高,能促进凝胶黏附于伤口表面。其渗透性允许抗生素渗入,可局部用于原位敷料表面。

粒子性和纤维性聚合物

这类敷料包括合成、半合成的和天然产物,如多糖。

1. 干凝胶

干凝胶敷料可认为是包含在多糖类敷料内的亚类产品。多糖类敷料还包括著名的纤维素类产品,如纱布和脱脂棉(见吸收剂部分),但由右旋糖酐小珠、琼脂和丙烯酸酯胺的干水凝胶、海藻酸钙纤维,以及干燥的支链淀粉聚合物颗粒组成的产品称为干凝胶^[24],即将水凝胶除去大部分水(或任何单一凝胶除去分散相后的剩余部分)。这些材料的配方中没有水,与水溶液接触时膨胀形成凝胶。

2. 粒子聚合物

聚糖酐

这种干凝胶是多糖右旋糖酐的聚合物。右旋糖酐是天然的葡萄糖聚合物,通过微生物肠系膜串珠菌培养产生。将包含水胶体分散相的右旋糖酐通过异氯醇和氢氧化钠化学交联形成凝胶^[24]。聚糖酐外观为小珠或糊状。这种材料需要第二层敷料。

市场上供应的聚糖酐小珠直径为 100~300 μ m,含有泊洛沙姆 187、聚乙二醇 300 和水。糊剂是聚糖酐分散于聚乙二醇 600。小珠可以是分散的颗粒,也可以包在低黏性的小袋中以供置入伤口空腔。一家公司(Pfizer)提供一种聚合物网,在添加颗粒或糊剂前置入伤口空腔,它易于除去。其也提供一种透气膜,覆盖于聚糖酐敷料,以控制水汽蒸发,延缓聚糖酐在低渗出伤口的干燥。

聚糖酐孔径的排阻限为 1000~8000 Da,能阻止病毒和细菌的吸附。微生物通过小珠之间的毛细管作用从伤口移除,而糊剂没有这样的功能,但它显著增强了吸收恶臭成分和炎症反应过程中释放的致痛剂的能力。

聚糖酐主要用作坏死和有渗出物创口的清创剂,不管伤口是洁净的还是受感染的;它还用于小面积的烧伤,主要是形成一个洁净的组织床,供生成肉芽组织。其使用期限不能超过某个阶段,延期使用会妨碍上皮的形成。聚糖酐不能生物降解,颗粒和糊剂在变干之前要用生理盐水仔細地除去,以免粒子残留形成肉芽肿。

3. 纤维性聚合物

3.1 海藻酸盐敷料

海藻酸是一种由 D-甘露糖醛酸和 L-古罗糖醛酸残基组

S

成的聚糖醛酸,主要从褐藻科藻类(主要为昆布)中提取得到。

海藻酸钙敷料是由海藻酸钠钙纤维或纯海藻酸钙纤维制成的平坦的无纺布衬垫。海藻酸盐伤口接触层可以黏合在第二层的吸收性纤维黏胶衬垫上。海藻酸盐束也是可用的,如用于深部创口空腔和窦的充填物及带状物。已经证明,海藻酸盐对于处理实质性组织损失的损伤有效。无黏性的配方还需要第二层敷料。

通过离子交换形成凝胶。当纤维与渗出液接触后形成可生物降解的凝胶,钙的作用促进凝血机理。凝胶可以是硬的,也可以是柔软的,依纤维中钙和钠的比例而定。凝胶可用生理盐水洗去。

其中,两种同质异构酸比例各异,这取决于海藻的来源。海藻酸钙能形成凝胶。古罗糖醛酸与钙结合,能激发产生水凝胶的连续分散相。钙离子和磷脂表面能促进凝血链化反应中凝血素的活化。海藻酸钙敷料能提供这些离子,在浅表伤口和在手术中作为可吸收性止血物用于止血。其生物降解率与制剂中钠/钙的比例有关。

用3%柠檬酸钠无菌溶液冲洗除去敷料再用无菌水冲洗,或者用无菌生理盐水也能洗去敷料。

敷料的湿完整性使其易于从伤口表面除去。敷料中掺入强度更大的纤维(如纤维黏胶人造短纤维),或者湿润后能与海藻酸纤维相互作用的纤维(如壳多糖人造短纤维)可以改善敷料的湿完整性^[25]。

海藻酸钙最主要的止血用途是用于窦道、瘘管和出血牙槽的填塞。海藻酸盐敷料最近广泛用于许多其他类型伤口的可溶性伤口填料。它们还用作有效的裂伤或挫伤伤口的非黏性敷料,对治疗肉芽组织过度增生(疤)、趾间皮肤浸泡发软和软鸡眼也十分有效。海藻酸钙在医院和社区的应用,包括难处理的皮肤溃疡和褥疮、糖尿病性溃疡、烧伤和外科感染性伤口。

已证明海藻酸盐是有用的清创剂。当用于这些类型的伤口时,海藻酸盐敷料必须覆盖泡沫或薄膜材料作为第二层敷料。一些专利产品将海藻酸钙黏合到第二层背垫上,如可吸收的纤维胶衬垫或半渗透黏性泡沫,以制成岛形敷料。

3.2 水胶体敷料

水胶体敷料由天然亲水聚合物的复合材料组成。这些敷料通常是柔韧性好、高吸收的封闭或半封闭的衬垫。此衬垫是由生物相容的亲水聚合物,如羧甲基纤维素钠、羟乙基纤维素、果胶和明胶,混入疏水性黏合剂组成的。这些敷料可以衬在高分子薄膜上,可做成波浪轮廓以适合包扎困难的区域。水状胶体也可制成糊剂、粉剂或凝胶。这种衬垫不需要第二层敷料。

一般说来,水胶体敷料由两层组成:第一层是压敏胶层,由所谓的水状胶体在增黏剂的帮助下分散在弹性胶中组成;第二层是由透气不透水、柔韧有弹力的材料组成的薄膜。现有的水胶体敷料是一种柔软的材料,内表面有黏附性,外表面为半透聚氨酯泡沫。其处方如下:

羧甲基纤维素钠	20%
聚异丁烯	40%
明胶	20%
果胶	20%

此产品也有处方相似的颗粒型,以便用连续的水胶体敷料处理较大的伤口内腔和渗出较重的伤口。

也有其他类型的水胶体敷料可供选择,由羧甲基纤维素钠和梧桐胶混合物或单独羧甲基纤维素钠组成。

水胶体胶黏处方的初黏力比一些外科胶带要强。使用后,其吸收了经皮的水汽改变了它的黏力,使其在使用过程中维持更高的黏附性。在使用部位,敷料提供了防气和防湿的环境,使其强力粘贴于伤口周围,防止失禁的或其他来源的污染。在伤口接触面,敷料吸收渗出物形成凝胶,在接触表面线性膨胀,具有更强的保湿能力。在剩余弹性敷料的持续支持和增压作用下,凝胶膨胀进入伤口腔内。这种体系的优点是深层溃疡的底部提供了坚实的压力,这是生成健康肉芽组织的基本外科原则。正是这种功能使它被推荐用于静脉曲张性溃疡的治疗^[26]。

成型的胶态凝胶也能对严重渗出液内的可溶成分产生吸着梯度,能去除细菌或细胞破坏产生的有毒物质。然而在使用中,接触伤口的敷料会液化,产生具有强烈气味的脓样液体。

水胶体适合腐败伤口和轻、中度渗出的伤口,但不能用于厌氧菌感染的情况。水胶体敷料已成功用于慢性腿部溃疡、压迫性溃疡、轻度烧伤、粒化伤口,以及有腐败或坏死组织的伤口或中等渗出的伤口,并在吻合口处理中作为皮肤屏障使用。

3.3 超强吸收剂

超强吸收剂水胶体敷料具有很强的吸收能力且能滞留吸入的渗出物,因此液体一旦吸收进去就很难被挤出。有一种产品将这种材料加入岛状衬垫,岛状衬垫覆盖有无纺布吸收层,周围有超薄水胶体作为粘贴部分。覆盖物在其表面保持干燥时,还能起转移层的作用。超强吸收剂推荐用于渗出严重的溃疡伤口^[14]。

3.4 亲水性纤维

亲水性纤维是羧甲基纤维素纤维,可制成扁平的无纺布衬垫。作为织物纤维,以针缝合成绒头织物,可以以带状物的形式用于充填空腔,也可以以扁平的无纺布衬垫形式用于较大的开放伤口。该敷料吸收并与伤口渗出物作用后形成柔软的亲水的透气凝胶,能截住细菌,符合伤口的形状,同时可提供有助于伤口愈合的微环境。形成的凝胶类似于片状水凝胶,不会完全干枯或在侧面起灯芯效应。因此,伤口周围的皮肤不会被浸软。高吸收能力减少了敷料更换的频率。

片状处方可以用于渗出性损伤,如腿部溃疡、压迫部位、供体部位,以及大多数其他粒化伤口,但对于较深的空腔和窦,带状充填更常用。该敷料易于除去,不会引起

疼痛和损伤,在伤口表面留下的残留最少^[14]。

浸渗敷料

最初,浸渗敷料用涂布在敞开网状纱布上的疏水石蜡覆盖于伤口区域,因此它既能隔热又能提供部分密闭性,但叠加的吸收衬垫能吸收过量的渗出物。浸渗敷料具有低黏性、允许气体扩散的优点。但其缺点是凡士林和松散的棉纤维会长入愈合的伤口中,导致炎症期延长,伤口愈合延迟。过量使用时,这种敷料也会导致渗出物积聚,引起周围健康组织的浸泡发软。

1. 石蜡纱布(薄纱)敷料

石蜡纱布敷料是一种涂布黄或白凡士林的漂白棉或棉和人造织物混合物。市场上供应的是无菌单片装或多片合装包。石蜡能防止敷料粘连伤口。纱布(可以是纱罗织物)的所有丝线都浸渍过石蜡,但丝线间的空隙没有石蜡。这种材料主要用于像烧伤和烫伤伤口的治疗,这些伤口已失去角质层的保护功能,水分会从体表散失。石蜡纱布敷料通过形成水阻隔层减少液体损失而发挥作用。

除了应用于烧伤和烫伤外,石蜡纱布敷料还用于撕裂伤、擦伤和溃疡的伤口接触层,作为促进肉芽生长的填充材料。还用作手术后阴道或阴茎的敷料以及窦道的填充物。

10% (w/w) 聚维酮碘、0.5% (w/w) 洗必泰、2% (w/w) 夫西地酸钠和1% (w/w) 硫酸新霉素是一些其他浸透敷料的例子,推荐用于减少伤口感染。抗菌药物在感染和渗出创面内或创面上的扩散很少。产生感染微生物耐药株的可能性减少了这些敷料的使用。

2. 银敷料

人们开发了先进的含银伤口处理产品以治疗难以愈合的伤口、慢性溃疡和大面积烧伤。银的纳米晶体代表了用于伤口处理的新的金属形式。银为广谱的抗菌活性剂,能杀灭如假单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌,并且对其耐药的报道也很少。尽管银为有效的抑菌剂,但因难以将其输送到组织,使其使用受到限制。纳米技术解决了这个问题,可以一次形成化合物的一个原子。纳米晶体结构供银释放的表面积更大。

游离的银离子为抗菌银的活性成分。已经证明,溶液中含有1ppm的银元素即能有效抗菌。将银加入聚合物、炭、水胶体等材料中不仅有助于处理伤口和愈合,还能调节银在伤口环境和周围组织中的释放。银离子通过抑制细胞呼吸和功能杀灭微生物^[27-30]。人们认为其作用模式是通过与酵母菌,如白色念珠菌的细胞壁的半胱氨酸残基结合,从而抑制了磷酸甘露糖异构酶(PMI)^[31]。该酶对于合成细胞壁非常重要,没有该酶,磷酸盐、谷氨酰胺和其他的营养成分会从细胞中释放出来。磷酸甘露糖异构酶不被大肠杆菌培养基中的银离子抑制^[31]。在伤口环境中,银离子能与蛋白质、细胞表面受体和伤口碎片结合^[31]。

有人认为,一些纳米银产品释放一簇银离子和原子团,因为在外层轨道有未成对电子,其抗菌活性很强。有报道说,这些产品释放的银和银簇通过影响电子转移、灭活细菌DNA、损坏细胞壁,以及结合并沉淀不溶性复合物起作用^[32]。

人们开发了先进的含银伤口处理产品以治疗难以愈合的伤口、慢性溃疡和大面积烧伤。吸附气味的敷料将极化的细菌吸附到处方中的炭织物表面,敷料中的银发挥了杀菌作用,随着伤口渗出物饱和该材料,作用逐渐消失。

3. 硅酮

硅酮为硅原子和氧原子交替排列的长链聚合物,有机基团接在硅原子上。聚合度决定硅酮的物理形式。软硅酮胶为固体硅酮的特别一类,柔软且有黏性。这些性质使其能黏附在干的表面。软硅酮敷料涂上软硅酮作为黏附层或伤口接触层,除去时不损伤伤口和周围皮肤。硅酮敷料在临床上用于替代凡士林纱布固定儿科移植皮肤,更换外层吸附性敷料和硅酮敷料时本身无痛感,不需要用镇痛剂^[33]。

通常,硅酮敷料具有多孔的、半透明的伤口接触层,为柔软的聚酰胺网涂上硅酮。该敷料不具有吸收性,但骨架中的小孔可供伤口渗出液流到第二层敷料上。其用途限于小的皮肤移植,因为该材料需要伤口周围至少有2cm边缘的健康皮肤。

硅酮敷料还用于处理放疗、指尖损伤、严重蕁样肉芽肿和表皮松懈。硅酮材料必须与伤口皮肤表面紧密接触才能发挥作用,这就意味着凹处伤口使用其有些问题,而在凸处、关节或不平处要用合适的衬垫,以排除敷料下的空隙,以免渗出物积蓄。由于硅酮为惰性材料,临床已经发现将外用的留醇和抗菌剂置于硅酮材料的表面或下面,不会影响其疗效。

有报道表明,将硅酮敷料用于厚痂和瘢痕瘤,能改善外观(痂大小、红肿和弹性)和症状(搔痒症、灼烧痛)^[34]。硅酮通过促进痂的水化和施加压力,从而压平痂组织,增加伤口弹性,并减少退色。

4. 组织黏合剂

组织黏合剂用氰基丙烯酸酯类化合物制成,如氰丙烯酸异丁酯、氰丙烯酸丁酯或氰基丙烯酸甲酯,在与液体或碱性物质接触后发生放热聚合,形成牢固的、柔软的防水键。将甲醛与烷基氰基乙酸酯反应生成聚合物前体,加热它可以降解为液体的单体。该单体通过修饰分子中的烷氧羧基(—COOR)得到不同链长的化合物。

组织黏合剂通常用于裂伤,其作用与缝合效果相当。要确保伤口边缘准确对齐,以免黏合剂从中流过。外用时尚没有致癌和毒性的报道。不能用于关节,因为反复运动会引起黏合剂脱落。

生物敷料

生物敷料由几乎专门来源于活组织的材料所组成,被

称为“积极有益地参与伤口愈合的生化过程和细胞活动”^[35]。它们可划分为生物敷料和生物合成敷料。依据其来源的不同,生物敷料可以进一步细分为天然的或培养的。

1. 胶原敷料 (生物合成敷料)

胶原敷料由来自于猪皮的变性胶原肽和纯化的牛皮胶原与氨基葡聚糖、6-硫酸软骨素交联而成,并冷冻干燥。当用于损伤组织时,此敷料能在加速上皮细胞迁移的过程中刺激成纤维细胞和内皮细胞的产生。这些生物成分与硅酮弹性体联合作用,以控制组织加速生长期的水汽散失^[36]。

制备这些敷料使用的从牛皮材料提取的I型胶原,由于经过酶纯化不具有抗原性。牛I型胶原为三螺旋形,可以与氧化的再生的纤维结合。该胶原螺旋能附着于非黏附性的背衬上,因而这些材料需要第二层敷料。在创面加入胶原可以提供细胞迁移的骨架,从而加速伤口修复^[14]。

胶原可制成大片状、颗粒、糊剂或凝胶。用于创面后,干性材料能吸收渗出物以形成凝胶。有一家生产商已在敷料处方内添加了10%的海藻盐。这些敷料推荐用于顽固性的没有坏死组织和感染迹象的伤口。

2. “天然”生物敷料

自体皮肤取自患者的健康皮肤区域,然后移植到伤口上,通常用于烧伤。这个过程会引起二次损伤或供体部位损伤。它的优势是无过敏,无毒性,无致热原性,能直接长入愈合区域,具有完整皮肤的所有性能参数。这些优点使这种敷料成为好的选择。

取自新鲜尸体的皮肤作为同种异体移植植物可以是自体皮肤的替代品。这种皮肤去除了成纤维细胞、上皮细胞和表皮,因为这些细胞会引起免疫反应。最终的产品为一种非细胞的真皮胶原基质,无免疫反应但保留了弹性蛋白、蛋白聚糖和基膜复合物^[36]。

3. 猪皮

灭菌变性冻干的猪皮,由真皮和(或)表皮层组成。这种材料通过浸入灭菌水或生理盐水而再生,将真皮层一侧应用于伤口。猪皮作为一种临时敷料用于烧伤或溃疡,特别适用于准备植皮的部位。

4. 培养的生物敷料

培养的生物敷料来自于哺乳动物细胞的培养过程。该过程能促进来源于患者自身的一些表皮细胞的细胞片生长。经培养的人角质化细胞构成培养的上皮移植植物,此移植植物并非生物工程组织而是用途有限的细胞培养物。这些培养物可以看成是通过生物工程开发的其他产品的前身^[36]。

5. 双层皮肤相当物

双层皮肤相当物可由活性真皮和表皮生长而来。表皮

由角质化分化角质细胞和皮肤基质组成。皮肤基质由含有活性成纤维细胞的胶原网格组成的。它的细胞成分能通过刺激创面帮助伤口封闭。分化的双层皮肤相当物的外层,即角质层,能起到透气膜和外部保护屏障的专门作用^[36]。

6. 人类真皮替代物

人类真皮替代物需要在三维聚合物支架上培养人类二倍体成纤维细胞。这些活细胞来源于新生包皮,在植入创面后能活跃地进行新陈代谢^[36]。

7. 透明质酸

来源于组织中的材料的透气黏附膜正广泛地用于伤口处理。大部分膜含有工业生产并纯化的透明质酸苄酯衍生物,可直接用于伤口,如糖尿病引起的脚溃疡、静脉炎腿溃疡,或者作为支架用于培养供移植用的成纤维细胞和角化细胞。

生物活性敷料

引言介绍了活性敷料的性能参数,使其区别于那些无活性敷料。目前的研发已确认,下一代的产品将通过生长激素、趋化因子、血管生成因子和其他生长因子,以储库释放的模式或作为连续释放混合物,积极地参与伤口愈合的过程,同时它还控制伤口的微环境^[37]。

每种处理伤口的敷料最终要设计成这样一种产品:能满足特殊类型伤口的环境、营养和生长需要,并很可能是基于以上提到的那些生物敷料的敷料。这类敷料将被命名为生物活性伤口处理产品^[38]。生物活性敷料已经包括抗菌敷料、生物来源的单组分辅料以及以上这些组分的组合。这些生物敷料一定会成为开发那些更令人兴奋产品的先驱者。这些新产品能改进伤口愈合中的病态,这对患者和医生都是有利的。

结论

本章的内容仅限于那些直接接触伤口的产品。还有许多其他不直接接触伤口的产品,也成功用于伤口处理。这些产品包括外科胶带、常用于固定敷料的无伸展性但具有依从性的弹力网状绑带、有别于轻支撑物的伸展性绑带、用于扭伤和肌紧张处理的加压绑带、单独或层叠其他敷料来压迫受伤肢体以防肢体水肿的高加压型绑带等。

参考文献

1. Breasted, I. H. Edwin Smith Surgical Papyrus Facsimile; University of Chicago Press; Chicago, 1906.
2. Najano, G. The Healing Hand; Harvard University Press; Cambridge, MA, 1975.

3. Mackinney, L. *Medical Illustrations in Medical Manuscripts*; Clowes and Sons; London, 1965.
4. Packard, F.R. *Life and Times of Ambrose Paré*; Milford; London, 1922.
5. Elliot, J.R. *Surgical Materials*. St. Barts Hosp. J. 1954, 58, 11—14.
6. *British Pharmacopoeia*; HMSO; London, 1998.
7. Winter, G.D. Formation of the Scab and the Rate of Epithelialisation of Superficial Wounds in the Skin of the Young Domestic Pig. *Nature* 1962, 193, 293—294.
8. Bull, J.P.; Squire, J.R.; Tophy, E. Experiments with Occlusive Dressings of a New Plastic. *Lancet* 1948, 2, 213—214.
9. Winter G.D. In *Epidermal Wound Healing Proceedings Conference on Surgical Dressings in the Hospital Environment* Turner T.D. Brain K.R. SDRU, UWIST Cardiff 1975; 47—83
10. Turner, T.D. Hospital Usage of Absorbent Dressings. *Pharm. J.* 1979, 22, 421—426.
11. Turner, T.D. Proc. Symp. Wound Healing Helsinki; Sundell, B., Ed.; 1979, 75—84.
12. Lock, D.M. Proc. Symp. Wound Healing Helsinki; Sundell, B. Ed.; 1979, 103—108.
13. Turner, T.D. Surgical Absorbents. *Africa Health* 1979, 1 (4), 22—24.
14. Turner, T.D. Absorbents in Surgery. Proc. Guild Public Pharm. Conf. York 1977, 56—59.
15. *European Pharmacopoeia*, 2nd Ed.; Maisonneuve SA; France, 1980
16. Ovington, L.G. The Well-Dressed Wound; An Overview of Dressing Types. *Wounds* 1998, 10 (Suppl. A), 1A—11A.
17. Dahle, J.S. Proc. Symp. Wound Healing Helsinki; Sundell, B. Ed.; 1979; 143—154.
18. Banks, V.; Bale S.; Harding, K.G.; Harding, E.F. A Randomised, Stratified, Controlled, Parallel-group Clinical Trial of a New Polypurethane Foam Dressing (Lyof foam Extra) Versus a Hydrocellular Dressing (Allevyn) in the Treatment of Moderate to Heavily Exuding Wounds Proceedings of 6th European Conference on Advances in Wound Management Leaper, D. J. Cherry, G. W. Dealey, C. Lawrence, J.C. Turner, T. D. Macmillan London; 1997; 235—238
19. Thomas, S. The Role of Foam Dressings in Wound Management. *Advances in Wound Management*; Turner, T.D., Schmidt, R.J., Harding, K.G., Eds.; John Wiley and Sons, Inc.; New York, 1986; 23—29.
20. Harding, K.G. Silastic Foam. *Advances in Wound Management*; Turner, T.D., Schmidt, R.J., Harding, K.G., Eds.; John Wiley and Sons, Inc.; New York, 1986; 41—52.
21. Banks, V.; Fear, M.; Orpine, J.; Hogelstrom, S.; Colgate, G.; Humphries J.; Disley, L.; Bale, S.; Thomas, S.; Harding, K.G. A Comparative Open Multicentre Trial of Tielle Hydropolymer Dressing and Granuflex Improved Formulation Proceedings of 5th European Conference on Advances in Wound Management Cherry, G. W. Gottrup, F. Lawrence, J. C. Moffat, C. J. Turner, T. D. Macmillan London 1995; 163—167
22. Turner, T.D. *Pharm. Int.* 1985, 6 (6), 131.
23. Nathan, P.; Law, E.J.; MacMillan, B. G.; Murphy, D. F.; Rouel, S. H.; D'Andrea, M. I.; Abrahams, R. A. *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Org.* 1976, 22, 30—41.
24. Eaglestein, W. H. J. *Amer. Acad. Dermatol.* 1985, 12, 434—440.
25. Yates, D.W.; Hadfield, J. *Med. Injury* 1984, 16, 230—232.
26. Myers, J. A. *Pharm. J.* 1983, 230, 263—264.
27. Schmidt, R. *Xerogel Dressings*. Turner, T.D., Schmidt, R. J., Harding, K.G. Eds.; *Advances in Wound Management*; John Wiley and Sons, Inc.; New York, 1986, 65—72.
28. Gilchrist, T.; Mitchell, D.C.; Burrows, T.R. *Sorbsan. Advances in Wound Management*; Turner, T.D., Schmidt, R. J., Harding, K.G., Eds.; John Wiley and Sons, Inc.; New York, 1986; 73—82.
29. Turner, T.D. *Royal Soc. Med. Symp.* 1985, (Series No. 38), 5—14.
30. Lofts, P.M. *Biodressings*. Turner, T.D., Schmidt, R. J., Harding, K.G., Eds.; *Advances in Wound Management*; John Wiley and Sons, Inc.; New York, 1986; 127—131
31. Mulder, G. T. The Role of Tissue Engineering in Wound Care. *J. Wound Care* 1999, 8 (1), 21—24
32. Turner, T.D. *Wounds* 1989, 1 (3), 155—179
33. Turner, T.D. *Surgical Dressings and Their Evolution Proceedings of 1st European Conference on Advances in Leaper, D. J. Harding, K.G. Turner, T.D. Wound Management Macmillan; London, 1992; 181—187*

参 考 书 目

- An Environment for Healing. *Royal Soc. Med. Int. Cong. Series* 1984, (88) .
- Bucknell, T.E., Ellis, H., Eds. *Wound Healing for Surgeons*, Balliere Tindall; London, 1984.
- Goldsmith, L. A.; Ed. *Biochemistry and Physiology of the Skin* Oxford University Press; Oxford, 1983; 1, 11.



S

Leaper, D. J., Harding, K. G.; Eds. Wounds: Biology and Management; Oxford University Press; Oxford, 1998.

Najano, G. The Healing Hand; Harvard University Press; Cambridge MA, 1975.

Peacock, E. E. Wound Repair; WB Saunders; London, 1984.

Turner, T. D., Schmidt, R. J., Harding, K. G., Eds.

Advances in Wound Management John Wiley and Sons, Inc.; New York, 1986.

Westaby, E. S., Ed. Wound Care; William Heinemann Medical Books; London, 1985.

(胡蓉梅 王 浩 吕坚伟 译)

设备清洁

Destin A. LeBlanc

Cleaning Validation Technologies, San Antonio, Texas, U. S. A.

S

引言

工艺设备的清洁很多年前已经成为药品生产 GMP 的一部分^[1,2],其中包括书面操作介绍、清洁日志和为使设备清洁方便而进行的合理的设备设计。良好的清洁习惯是保证所生产的药物或药品的安全性和有效性所必需的。不适当清洁可能导致的结果包括交叉污染(一种药物存在的数量对另一种药物的敏感性达到不能接受的程度)、存在外来物料(如清洁剂、溶剂或另一种药品的赋形剂)、微生物污染[数量和(或)种类],或者产生内毒素(尤其在不经肠胃道的产品或眼用产品中)。药品中这些污染的存在根据污染程度的不同可能导致各种安全问题,也可能影响药品的疗效,包括改变活性物质的生物利用度、药片的溶出时间,或成品的稳定性。更不用说,未能遵守 GMP 关于清洁方法的要求也会导致产品“掺假”,而受到法规的处罚。

法规背景介绍

1. 验证期望

1990 年以后新的情况是期望在药品生产过程中清洁验证要在法规上生效。在此之前,清洁验证的有效性已经在许多文章中讨论过^[3,4],但是控制不佳的清洁过程^[5]引起了产品污染的争端并导致 Barr 实验室决定将问题推到首要地位^[6],并促使 FDA 做出明确规定,要求清洁验证在法律上生效。由于清洁是一个过程,因此清洁验证的原则适用于清洁过程。Barr 的决定后不久,1992 年^[7]和 1993 年^[8] FDA 公布清洁验证的指导文件。1996 年, FDA 建议修订 GMP,明确规定清洁验证为 GMP 要求的^[9]。美国 FDA 首先要求清洁验证,其他文件,包括 Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme (PIC/S) PR-1-99 文件^[10]、EU GMP 草案附录 15^[11]以及 Canadian Therapeutic Products Programme “清洁验证指导”^[12]也都规定了类似的要求。虽然最初重点是在有关成品制剂的清洁验证上,但是后来补充的指导文件明确了原料药^[13,14]与药物赋形剂^[15]的生产也需要进行清洁验证^[15]。

2. 清洁验证的适用性

需要注意的是,只有关键的清洁工序才要求清洁验证。虽然 GMP 要求地面、墙壁、生产设备外表面都需要清洁,并且要有清洁的标准操作程序(SOP),但是这些工序并非关键清洁工序。关键清洁通常包括与产品接触的设备或器

具的表面。这些与产品接触的表面可能会直接污染下一个使用同一设备的产品。此外,不与产品接触的表面如果可能会间接污染随后生产的产品,也应该考虑清洁验证。比如,有些公司出于主动或者法规的要求对冷冻干燥机内表面进行清洁验证。另外,对同一种产品不同批次间的清洁验证不做要求^[16],因为交叉污染问题并不存在。但是,认为其他方面的污染(如产品的降解物、清洁剂残留物或者微生物)的清洁很重要,因此应该进行验证。

清洁工序

整个清洁工序包括弄脏的设备、相关设备的清洁方法、清洁剂以及工艺参数(时间、温度等)。这些因素都应写在清洁标准操作程序(SOP)中。

1. 设备设计

对于需要清洁的设备,要考虑设备本身以及需要被去除的残留物。理论上,需要清洁的设备在设计时已考虑到清洁问题。设备设计的要求根据人工清洗还是自动清洗而异。设备的设计也影响到清洗过程中设备的拆卸。设备的设计特点是要最大限度地达到清洗目的,包括尽量减少死角、防止污染物嵌入裂缝与缺口,使清洁液尽可能到达设备难以清洁的部分,并且有合适的排水系统。设备材质的选用也应该考虑清洁过程,某些材质会影响化学(如酸、碱和溶剂)和物理(如温度)的相容性。由于要清洗的设备不同,很难概括全部可能性,但是原理是一致的,清洁过程的选择受到原始设备设计的限制,除非设计能够修改。

2. 清洁方法

虽然有时将清洁方法分为在线清洁(CIP)和离线清洁(COP),但是根据清洁方法的两大特点来对清洁过程分类更有用。

2.1 自动化程度

清洁过程一个因素是自动化程度,“自动化”的连续统一体的一个极端是全自动工序。无需操作人员参与清洁液制备、清洁、机器拆卸和重新组装。操作人员只需在清洗周期开始时按下按钮,在清洁日志上记录下清洁过程,也许还需要在清洁结束[和(或)在下一产品生产前]进行目测检查,作为监控清洁过程的一部分。另一个极端是完全人工操作。操作人员要准备清洁液、分离需要清洗的系统、使用清洁液,也许用刷子或抹布进行手工操作,冲洗系统,监测工艺参数(包括所有项目的计时)。应该清楚的

是,在两个极端之间还有各种半自动方法,这些方法也有广泛的连续性。

2.2 拆卸范围

清洁过程的另一因素是拆卸的程度(以及接下来的重新组装)。全自动清洁过程完全不需要拆卸设备(真正的在线清洁)。完全人工操作要求拆卸设备的每个部分进行清洁。最好能避免拆卸和组装设备,原因包括拆卸增加了整个清洁过程花费的时间(设备停工期)、拆卸/重装过程的外力对设备造成破坏,以及重装错误。但是应该承认有些情况下局部或完全拆卸设备还是必要的。如清洁前移去过滤器,或者在线清洁系统中,打开容器放置便携式喷雾器。

2.3 简化清洁过程

清洁过程的设计不仅必须考虑过程本身的特性,还必须考虑需要清洁的设备的工程设计、在该设备中生产的各种产品(这些产品在生产结束后成为污染物,需要加以清除),以及清洁过程的参数(后面会详细讨论)。对许多药厂来说,目的是尽可能使清洁过程简化和通用,使得一个清洁 SOP 能够适用于在同一设备内生产的所有产品,或者使同一个清洁方法适用于所有设备。这样做可以简化文件和培训过程,同时通过归类的策略简化验证过程。

2.4 清洁步骤

一般清洁过程有以下步骤:

拆卸和分离:包括准备设备用清洁液。拆卸可以为了清洗设备的各部分而进行完全拆卸,也可以局部拆卸,比如移去过滤器分开清洗。首选的清洁技术是把设备(或部件)分开,然后清洗整个分离的部分。认可的验证方法中,不可以只清洗设备的某一部分而不把设备拆卸(如只清洗储罐中产品接触到的地方。整个储罐,包括罐顶,都应该清洗)。

预洗(预冲洗):指用水(通常在室温下)冲洗系统的所有部分,用水流物理地去除污染。预洗的目的是尽量减少清洗表面的污染物。这样,清洁过程中的清洁剂就能专注于洗去粘在表面上的较顽固的残留物。在生物产品的生产或生产中涉及蛋白质沉淀物时,预洗的另一个目的是马上用热水清洗以防止蛋白质沉淀物的“沉积”。假如清洁过程用的是在线清洁(CIP)系统,那么预洗步骤通常是“从开始到排放”一次性排放过程而非循环过程,目的是迅速除去粘得不牢固的污染物并从设备中排去,而不是让污染物均匀地分布于设备的整个表面(在循环系统中这种现象在一定程度上会发生)。

洗涤:指在设备表面用清洁液(可以是水,但通常添加一些清洁剂)有效地去除未能在预洗时被去除的污染物。清洗可不断地用新鲜的清洁溶液(例如,在非再循环的在线清洗系统中或在人工清洗中使用高压喷雾软管),或将使用过的清洁液重新用于设备表面(例如,在循环的在线清洁系统或自动机器部件清洗器),或静止浸泡设备及器具。

目的是为了溶解、增溶、乳化、悬浮或化学处理设备表面的污染物,使其在洗涤(非循环过程)和(或)冲洗过程中容易地从设备表面除去。

冲洗:是为了除去设备上的洗涤液和相关可溶的、已溶的、乳化或悬浮的污染物。对于溶剂清洗,冲洗时通常使用与洗涤过程所用的相同的新鲜溶剂。在水溶液工艺中,冲洗液通常就是水。冲洗这一步所用的冲洗液不再循环使用。产品包括水溶性药品,生产结束后,下一步非常重要的规则是最终冲洗的水质至少应该和下一个产品生产所用的水质相同。它的原则是最后一次冲洗后留在设备表面的水及其污染物都与下一产品生产时所用的水质一致。假如药物不含水,如生产合成的有机活性物质,则最终冲洗用水的质量的选择会有其他考虑。原料药生产的常用做法是凡可用水来清洗的地方,最后一次冲洗使用去离子水。

干燥:是可选步骤。是否需要干燥的一个因素是下一次使用设备的时间间隔。假如马上(或在几小时以内)就使用设备,则无需干燥,尤其是假如设备能够有效地排干,可减少残留冲洗水或溶剂的稀释影响。但是在设备闲置期内,残留水对于微生物繁殖的影响依然是个大问题。干燥可以用热(可以是经过过滤的)空气,以及最终冲洗用酒精与水混合液。因为酒精可以抗菌,所以最终冲洗用酒精与水混合液可以进一步降低生物负载,但是也需要考虑酒精与水混合液的易燃性。

重装与存放:这是清洁 SOP 的一部分。“重装”包括移去暂时安装的清洁设备(如 CIP 中的便携式喷雾器)或设备本身部件的重装。假如设备在下一次使用前需要存放很长时间,存放的关键因素包括设备是否干燥、设备是否有物理保护以防止再次污染(如使用塑料包装套),以及存放设备的房间条件(空气质量、温度和湿度)。存放的设备需要标记已清洁和清洁有效期(或使用期限)。清洁设备有效期根据存放期内再次污染可能发生的途径和程度而定。对于设备的存放,管理部门需要重点注意的是微生物污染,但是其他类型的污染也需要评估。

2.5 自动在线清洁系统

由于工业上越来越趋向于使用在线清洁,在线清洁过程值得特别讨论。正如广义理解的那样,在线清洁指所有设备清洁不需要或很少需要拆卸系统。狭义理解(这种理解现在更常用)是,在线清洁指设备清洁时需要放置一个或多个喷雾器的系统。一个控制单元、一个泵、相关的阀门以及 PLC(可编程的程序控制器),将清洁液通过喷雾装置从储罐中吸出。喷雾器的设计与安置使溶液可以直接喷射或以其他方式喷射在设备侧壁,覆盖设备的所有表面,进行有效的清洁。在非循环的在线清洁系统中,清洁液流过反应容器和相关管道,然后排放出去。在循环系统中,清洁液流过反应容器和相关的管道后,回到清洁液储罐中,然后通过喷雾器再次喷洒,多次使用。

喷雾器可以永久地安装在容器上,也可以只在清洁时安装、生产时移去。喷雾器可以是固定的。最常用的固定

的球形喷雾器称为“喷雾球”。喷雾球通常是不锈钢钻孔的空心球。孔的位置的设计是为了使清洗能够覆盖整个容器。固定的喷雾器常被认为是“清洁的”，因为它们可以自动排水。另一种喷雾器是动态（或旋转）喷雾器，原理类似于固定喷雾器（两者的设计都是为了将清洁液分布到反应器的全部表面），但是动态喷雾器会在一个或多个平面上旋转以更均匀地分布清洁液。动态喷雾器在高喷射压下运行，清洁液在容器表面的冲击可以产生更多机械能以冲走残留物。动态喷雾器由于自身不能排放（因而不清洁），因此不能永久性地安装在反应器上。但是一些新的动态喷雾器据称是清洁的。

喷雾装置的操作和验证的关键是做“覆盖率”的试验，如“核黄素试验”。核黄素易溶于水，并且在紫外灯下能发荧光。这种试验是将稀的核黄素溶液喷射在设备内表面，然后像非循环模式那样用水进行短暂的在线清洁冲洗，接下来用紫外灯检测容器内表面。假如表面呈荧光绿，表示这些表面未能被清洁液覆盖到。假如覆盖率很差，则应该重新设计喷雾器系统，如增加喷雾器，或者更换不同的喷雾器，或者在固定喷雾球上钻更多洞。改进后的喷雾系统再次做覆盖率试验。核黄素试验通常是设备运行确认(OQ)的一部分。

3. 清洁剂

3.1 水溶液与非水溶液

除了所使用的清洁方法外，洗涤时使用的清洁剂也很关键。应该意识到清洁方法和清洁剂的选择是相互关联的。清洁方法的选择会限制能有效使用的清洁剂的选择范围。举个例子，在线清洁过程要求低泡沫的水性清洁剂，然而泡沫的多少对于人工清洁不是很关键。清洁剂可以分为水溶液与非水溶液。非水溶液清洁剂通常是溶剂，经常用于清洗大量生产活性药物（APD）的设备。一般清洁所用的溶剂与生产所用的溶剂相同。清洁效果依赖于残留物在清洁温度下在溶剂中的溶解度。尤其是蒸馏塔的清洗，用易挥发的溶剂进行回流是常用的有效清洗方法。现在原料药生产中的清洁趋势正在从用溶剂清洁转变为用水。但是，许多情况下，用水清洁并不可行，即使可行，清洁后也需要用一种或多种溶剂冲洗将水从容器内带走。

3.2 水溶液清洁剂的种类

水溶液清洁是指用水清洗，也可以选择加其他成分以帮助清洗。因为成本问题（包括溶剂的成本和处理回收溶剂的成本）以及溶剂的利用和泄漏引起的环保问题，假如能够用水清洗，当然比溶剂法好。水溶液法最好考虑只用水，这样的话，清洁验证时可以不考虑清洁剂带来的可能污染物。然而，大多数情况下，各种水性清洁剂的使用特点要比清洁剂残留物问题更麻烦（尤其当选择的清洁剂是免冲洗时）。单用水清洗时效果只取决于残留物在清洁温度下在水中的溶解度，而不提供乳化或分散等清洁机制。因

而，只用水清洁无法满足类似于短时间处理等目的。

水溶液清洁还可以使用日用化学品，包括碱类物质（如氢氧化钠、氢氧化钾）和酸类物质（如磷酸、柠檬酸，或次氯酸钠溶液）。通常将这些化学品用水稀释至 0.05%~1% (w/w)，使用时将溶液升温到 45~80℃。化学品清洗比水的效果好，并且相对来说成本也不高。验证时清洁剂的残留物检测也相对比较简单，因为通常只需监测清洁剂本身一种化学物质。

水溶液清洁的第三种选择是使用混合清洁剂。这种清洁剂通常含有几种功能成分，包括表面活性剂、碱或酸、能与水混溶的溶剂（如乙二醇醚）、分散剂（如低分子聚合物），和螯合剂等各种增洁剂。因为含有不同的成分，所以这种清洁剂的最大优点在于多功能，每种成分都扩大了它的作用功能，从而能去除多种污染物。好的混合型清洁剂使药品生产商可以只用一种清洁剂、用一个清洗 SOP，不仅能有效清除制剂产品中的各种其他成分，还能拓宽可适用的制剂产品的范围。需要指出的是，许多成品制剂的清洁中，赋形剂是较难清洗的（相对于活性物质而言）。但是，选用混合清洁剂时，药品生产商必须了解其成分，必须确认成分始终不变，并且能够有效地建立清洁剂残留物限度。

3.3 清洁剂选择的基础

假如只有水，或只有日用化学品水溶液，那么水溶液清洁系统的选择就可以简化。清洁效果可以通过溶解度（在合适的 pH 下）预测，或根据蛋白质在碱性中的胶溶特性，或次氯酸钠对变性蛋白的氧化作用来预测。混合多功能清洁剂的清洁效果仅根据化学性质较难预测，合适的清洁剂需要根据经验或实验室的研究来选择。有时清洗需要同时使用两种清洁剂（一种主要清洁剂和一种功能添加剂），或连续使用两种清洁剂（例如，先使用碱性清洁剂，接着使用酸性清洁剂），这样也使得清洁剂的选择变得很复杂。

4. 清洁参数

虽然清洁方法和清洁剂的选择非常重要，但整个清洁系统的各种参数的设定也同样重要，包括清洁过程参数以及有关实际清洁系统的参数。最重要的清洁过程参数可能是清洁时间、温度、清洁剂浓度、水质、清洁液的冲击作用，以及清洁液中的所有成分混合比例。

4.1 时间

有三个时间段对清洁过程很重要。首先是生产结束到清洁开始之间的时间。这一点在清洁验证中非常重要，因为污染物的性质可能会随时间发生变化。变化包括残留污染物的干燥（会导致清洗更加困难）和微生物增殖（会增加清洁过程的生物负载）。必须确认生产结束至清洁开始的最长间隔时间，清洁验证必须选择在最差的条件下的最长间隔时间。第二是各清洁步骤需要的时间，以及各步骤

S

之间的间隔时间,包括预洗时间、洗涤时间和冲洗时间。根据实验室与中试研究结果编写清洁 SOP。这三个步骤的间隔时间可能很重要,如果是这样,则应该明确最长的间隔时间。例如,人工清洗一个较大设备,假如清洗时所用到的清洁剂在冲洗前允许其变干,那么洗涤与冲洗的间隔时间就可能很长。洗涤后的干燥可能造成污染物再次沉积,并妨碍有效的冲洗。清洁验证要求把各阶段所需要的时间都予以明确。工艺验证通常不接受无时间限制的工艺,比如“一直检验到设备干净”,那就意味着不停地重复清洁直到检验结果显示设备干净。这就说明清洁过程没有受到控制。第三是清洁后的设备存放时间。虽然通常认为设备的再污染与事故有关而非时间,但是时间会造成微生物繁殖。因此清洁验证要求建立清洁设备的有效期,或允许使用的期限。

4.2 温度

第二重要的参数是温度,不仅包括清洁溶液的温度,也包括预洗溶液和冲洗溶液的温度。溶液温度对清洁效果的影响非常大,如溶解速度和水解程度。清洁时最好能够控制温度。然而,保持温度的前后一致要比只保持相同温度更重要。如果前一次清洗温度的下降与下一次清洗温度下降相同(由于在清洗系统内缺少热交换器),那么这种前后一致的温度下降清洁验证是可以接受的。一般预洗的温度为室温,以防止温度过高有残留物沉积。冲洗温度可能是三者中最不重要的。然而,冲洗温度越高,冲洗速度越快。另外,假如第一次冲洗的温度比清洁溶液温度低很多,这种温度的“冲击”会导致已乳化的污染物被“破坏”,污染物重新沉淀在设备表面。温度应该控制在合理的限度内,如控制点的 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 之内。

4.3 清洁剂浓度

应该指定清洁剂浓度并加以控制。清洁剂浓度经常以质量比或体积比来稀释控制,或稀释到某一已知的控制点,比如已知的电导率。在水溶液清洗的合理的限度内,清洁液浓度越高,清洗效果越好。清洁液浓度较高时,需要考虑对于设备的损坏和人工清洁的安全问题。

4.4 水质

在某些情况下,水质可能是清洁的关键。假如清洗步骤用到表面活性剂,那么众所周知,硬水离子(钙和镁)会干扰去污效果。另外,碱性物质会升高 pH,钙离子会变成碳酸钙沉淀。这种沉淀如果不从设备表面除去,会导致设备目测不干净。一些混合型的清洁剂有螯合剂(如四乙酸乙二胺的盐),可以减少这种情况的发生。在绝大部分清洁过程中,药品生产商也使用与药品生产相同水质的水(纯水或注射用水)。水质较差的,如自来水,在使用时如果能严格地监测水质(化学物质和微生物),也可用。另外,假如自来水的水质是变化的(如由于季节或水源的关系),那么为了验证必须考虑水的最差情况。

4.5 清洁液的冲击作用

清洁液的冲击是指清洁溶液从喷雾器喷出冲撞到设备表面的物理作用。这种喷出可以指从在线清洁系统中的喷雾器中喷出,也可以指从高压软管中喷出。冲击产生机械作用以去除表面的残留物。假如脱落的残留物能够悬浮、乳化或以其他形式脱离设备表面并从清洁系统中除去,那么这种冲击就是有用的。如果脱落的残留物仅仅是在设备表面移动位置,则说明冲击没有用。有些情况下,在冲击的溶液中加入清洁剂可能更佳。

4.6 混合

混合是指在清洁溶液自身范围内的移动。采用静态清洁时,随着设备表面的污染物溶解、乳化或转移到清洁溶液中,由于清洁液饱和或部分饱和,设备表面附近的清洁液浓度发生梯度变化。这种浓度梯度变化使化学清洁作用减到最小。混合能够消除这种浓度梯度现象,使新鲜清洁溶液(或者至少是饱和度较小的清洁溶液)与设备表面的污染物接触,完善清洁工艺。理想的混合方法是使清洁液能够湍流。

以上讨论的六个参数通常能够通过清洁工艺的正确设计来控制。其他对于清洁重要的参数更多地由设备的设计或生产工艺的设计来控制。这些特征包括设备表面的性质、污染物的物理性质和污染物的数量。

4.7 表面性质

在去除设备表面的产品污染物时,表面性质也会影响清洁过程,包括污染物在不同表面的黏附力等特殊因素。不同表面指不同种类的不锈钢、玻璃和各种塑料。在清洁验证的取样计划中应考虑各种有代表性的表面对去除污染物的有效性。不同表面也指表面本身不同的粗糙度或平滑度。虽然在此问题上依然存在争论,但是在药品生产中普遍认为表面越光滑越易清洁。这可能与粗糙的表面有裂缝或缺口有关,污染物容易“隐藏”。例如,被腐蚀的玻璃一般比高度抛光的玻璃表面难清洁。在考虑表面性质时,第三个因素是清洁溶液与表面本身的化学或物理相容性。清洁的目的是去除污染,恢复表面的原始状态(或尽可能接近该状态)。举两个关于基质相容性的例子:反复在不锈钢容器上使用高浓度的次氯酸盐导致表面变得粗糙;高温下在内衬玻璃的容器中长期使用高浓度的碱性水溶液(氢氧化钠或氢氧化钾)会腐蚀玻璃表面。其他可能还有塑料或垫圈的材质与温度相容性问题。虽然任何清洁过程都存在有损害的影响,但是在设计清洁工艺时应该达到能够有效清洁,而尽可能减少基质的相容性问题。

4.8 污染状态

另外一个需要考虑的因素是污染本身的状态。需要考虑污染的三种“情况”——新沉积的污染、干燥的污染和烘干的污染。后两个的区别在于干燥仅指去除污染物中的

水分而无化学变化。烘干不仅指除去水分，还有明显的化学变化，这种化学变化常导致污染更加难以去除。例如，表面上干燥的糖只是比较难以去除，然而在高温下烘干会使其变成焦糖而非常难以去除。污染的状态会根据生产工艺的状态发生改变。例如，产品会溅到容器顶部有蒸汽夹套的地方，于是在容器表面烘干。也可以由于生产后没能及时清洁导致产品干结，必须指出在设备表面干结的某些聚合物会非常难以去除。例如，羧甲基纤维素（CMC）溶液干燥后会非常难以从容器表面除去。

某些工艺很难控制干燥和烘干的程度，假如发生了此类现象，应该对这些现象进行评估，而且所设计的清洁工艺应该能够去除干燥或烘干条件下形成的污染物。

4.9 污染量

第三个需要考虑的因素是设备表面的污染物数量。通常，污染量越大越难清除。新沉淀的污染物如果能在预洗时大量除去，那么就没有大问题。然而预洗对减少设备表面干燥或烘干的污染物的作用很小。不幸的是，设备表面很可能有大量污染物的地方（死角、裂缝、缺口、低流速区）也是难以清洁的部位，因为清洁溶液也很难到达。清洁工艺的设计目的应该考虑到污染量最严重的情况。

与验证有关的清洁策略

虽然清洁工艺的建立主要应该根据达到良好清洁的需要，但是也可以根据验证法规的需要稍作改变。大多数制药公司希望清洁验证后在不久的将来不再有额外的大量再验证工作，这就限制了清洁剂的选择。由于任何被验证的清洁工艺关键在于其一贯和可控性，所以被验证的过程的清洁 SOP 通常也必须更详细和更明确。

1. 多产品设备的清洁

用于生产两种或两种以上产品的设备的清洁策略可能有多种。一种选择是在一个设备中每一个产品有一个最好的清洁工艺。这就意味着每个产品生产结束后用不同的清洁剂清洗，尽管通常是不同的工艺条件 [如时间和 (或) 清洁剂浓度] 用同一种清洁剂。每一种生产的产品都有自己专有的清洁 SOP。另一种选择是所有产品在同一个设备中只用同一种清洁工艺，一个清洁 SOP (所有工艺条件都相同) 用于所有产品。采用这种策略在验证文件中可能要考虑“编组”或“分类”的方法。然而，应该意识到，所有产品使用同一个清洁 SOP 意味它包含清洁和验证两方面。“所有产品使用一个 SOP”的策略对于简化文件和简化培训是有利的。不管怎样，这种策略可加以采用，而不管验证是否采用分组的方法。同样也可以采用混合策略，即几种产品的清洁用一个 SOP 做清洁，而另一组产品 (用同一台设备生产) 用另一个 SOP。

2. 清洁周期

同一种产品连续在同一设备中生产，各批次间的清洁

可以使用较简单的清洁过程。因为这种清洁无需考虑活性物质的交叉污染。但是有关这方面的清洁还是有几点需要考虑的。首先是每批的完整性问题——多少活性物质或产品可以混到下一批，遇到产品召回情况时怎么算一批？另外，尽管不会产生交叉污染问题，但清洁剂的残留物和微生物污染必须予以考虑。周期生产的另一个问题是，清洁的要求是降低设备上可能会有产品降解物的积累。

验证问题

1. IQ/OQ/PQ

清洁验证是工艺验证的一种，工艺验证的原理^[17]同样适用于清洁验证。包括安装确认 (IQ)、运行确认 (OQ) 以及性能确认 (PQ)。IQ 和 OQ 注重清洁过程中用到的设备，如在线清洁的滑行者、喷雾器，或监测设备 (如电导率探头)。PQ 包括清洁过程中三个惯连的清洁时间以及对清洁过程的评估，通常通过测定已清洁的设备表面可能存在的污染物数量或程度来进行。清洁 SOP 的确认需通过三次 PQ 评估清洁 SOP，并且尽可能采用正常范围内的最困难条件。例如，假如从生产结束到清洁开始最多是 12h，那么至少有一次 PQ 要用 12h 的条件来进行，以证明工艺是适当的。

清洁验证不同于其他工艺验证，清洁验证不仅涉及需要清洁的产品，也要考虑下一个要生产的产品。清洁 SOP 以如何除去生产后的产品为目的。然而，清洁后的残留物类型和可接受限度也由将在该清洁设备中生产的下一个产品的性质所决定。因此，清洁验证更重视在同一设备中生产的其他产品。此外，如果在已经做过多种产品清洁验证的设备中增加一个新产品，需要对以前的验证进行重新验证，以决定以前验证的残留物可接受限度也能适用于新的“下一产品”。

2. 残留限度

清洁工艺的验证包括选择目标残留物并对残留物设定清洁后的限度。目标残留物的选择是根据清洁过程后可能留下的残留物。这就需要理解清洁工艺，并且需要研究清洁过程中可能出现的降解物。这些特定残留物的可接受标准是根据这些残留物对下一产品的污染会产生什么影响确定的^[18,19]。要求对残留物进行分析测定。除此以外，要求对设备清洁进行目测。目测检查需要对观察者进行培训，并且需要有辅助的照明设备。目测检查可以进一步使用摄像机做记录，对于管道可以使用内孔表面检查仪。有时，可以拆卸设备做目测检查 (以及分析取样) 以测定是否清洁。

2.1 下一产品中的限度

清洁过程中残留物限度可以有不同方式表示，为了理解这一点，任何有关“残留物限度”的讨论都非常重要，

S

其中包括残留物在下一产品中的限度、残留物在已清洁的设备表面的限度,以及残留物在分析样品中的限度。这些都是相互关联的,但是通常它们的数据不同。在清洗一种成品药时,其活性物质在下一产品中的限度的计算,是按照下一产品的最大日剂量中该活性物质的最小日剂量再乘一个安全系数(通常是0.001或更低)进行的。下一产品中活性物质或活性物质限度并不相关,除非有报道会发生不寻常的毒性相互作用。限度的计算也与生产问题无关,如批量和设备表面积,只是与两个产品的剂量有关:

$$L_1 = \frac{\text{MinDA} \times \text{SF}}{\text{MaxDSP}} \quad (1)$$

式中: L_1 是活性物质在下一产品中的限度; MinDA 是活性物质(即目标残留物)最小日剂量; MaxDSP 是下一产品最大日剂量; SF 表示合理的安全系数。需要注意单位的选择, L_1 通常使用 $\mu\text{g/g}$ (或 ppm)。

2.2 单位表面积限度

另一种限度的计算是设备单位表面积的限度。这种限度的计算是根据活性物质在下一个产品中的限度、下一产品的生产批量以及设备占用面积,表示为

$$L_2 = \frac{L_1 \times \text{BS}}{\text{SSA}} \quad (2)$$

式中: L_2 是单位表面积限度; BS 是批量; SSA 是设备占用面积。单位必须一致, L_2 常用 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 表示。

2.3 分析样品中的限度

另一种限度是分析样品中的限度。假如取样是用擦拭方式,那么必须考虑擦拭面积和稀释剂的量。每一次擦拭的样品限度计算如下:

$$L_3 = \frac{L_2 \times \text{SA}}{\text{AD}} \quad (3)$$

式中: L_3 是每一次分析样品的限度; SA 是擦拭面积; AD 是用于洗脱药签的稀释剂的量。单位也需要一致, L_3 常用 $\mu\text{g/g}$ 或 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。应该清楚,分析样品中的限度可以通过改变取样面积(面积大则限度高)或稀释液用量(量少则限度高)而改变。假如采用冲洗液取样,那么 SA 实际上就是设备的总面积, AD 就是冲洗液的总量。

2.4 无剂量限度

对于没有确定剂量的残留物(如清洁剂),则以毒性作为残留物的量度,如每日允许摄入量(ADI)。假如下一产品是体外诊断(IVD)产品,没有明确剂量,那么就需要评估目标残留物对于 IVD 产品的性能或稳定性的影响。这些无剂量因素只用于 L_1 , 不改变 L_2 和 L_3 的计算。

2.5 多种品种生产的限度

在多种品种连续生产时,一个产品的残留物限度的计算方法是测定并比较每一个后续产品的单位表面积残留物限度(L_2)。如果产品的生产先后顺序不受限制,则第一个产品的清洁验证应该采用最低表面积残留物限度。

3. 取样步骤

已清洁的表面取样步骤可以分为四类:直接表面取样,指光学纤维取样(如红外取样)直接放在表面上,结果表示残留物类型和残留物量。这种方法目前正处于发展阶段^[20],但是就商业而言并不实用。擦拭取样,指用事先润湿的药签擦拭表面的固定面积。擦拭是为了除去表面的所有残留物,然后将药签放入稀释剂中,使残留物从药签上溶入稀释剂中。通过合适的分析技术测定稀释剂中的残留物。这种擦拭取样通常被称为“直接表面取样”,但显然这并非直接取样法。冲洗取样,指用固定量的冲洗液(水或溶剂)冲洗设备表面,收集冲洗液,然后测量冲洗液中的目标残留物。真正的冲洗取样与最终的工艺冲洗不同,可以使用与工艺冲洗不同的溶液。对照品取样,指在已清洁的设备中生产的下一产品做一对照品。把对照品进行取样和分析,测定目标残留物。对照品中的任何目标残留物都来自于已清洁的设备,可以期望对照品中的任何残留物水平就是任何下一产品中的残留物水平。对照品取样未被广泛采用,因为规章关注从设备表面取得的对照品的污染物的一致性,以及测定对照品中低含量的残留物时的分析技术问题。

4. 分析方法

4.1 与目标残留物的关系

所选的测定目标残留物的分析方法必须对目标残留物进行直接的测定。当管理当局最初要求清洁验证时,一些公司仅仅用 USP 纯水标准检验冲洗水,来测定设备是否清洁。理由是排放的水符合新进来的水的标准。管理当局(非常正确地)拒绝了这种理由(因为可能主要药物达到不能接受的水平,并且也可能目标残留物并未通过冲洗而去除),因此要求分析技术针对特有的目标残留物。然而测定残留物的分析方法的要求与测定成品中活性物质的要求稍有不同。对成品中活性物质的测定,要求在有可能存在干扰的情况下能够明确地测定活性物质,并提供准确的活性物质含量。对于清洁验证的残留物分析,准确地知道有多少残留物存在并不那么重要,而是要知道残留物的存在量是否低于验证方案中可接受限度。因此,特异的和非特异的分析方法都能用于残留物的测定。

4.2 方法专属性

最好能使用专属的方法,这样能更准确地为评估可能存在的问题提供信息。因为排除了可能存在的干扰的影响,能更好地符合可接受的标准。残留物测定最常用的方法是高效液相色谱(HPLC)法。相反,非专属的方法,如有机碳总量(TOC),如果没有负干扰(即所有干扰对于分析反应都是正干扰),只能提供目标残留物的高限值。对于 TOC,经常是这样。假如将分析结果看成只来自目标残留物,那么就能计算出目标残留物的上限。假如上限低于可

接受标准,那么就能说残留在可接受限度以内。非专属方法,如 TOC,通常用于生物技术产品的生产,因为蛋白质类活性物质易于在清洁过程中降解。在这种情况下,把 TOC 值中的碳当作只来源于蛋白质活性物质。事实上,某些碳可能来自清洁剂,某些来自赋形剂或工艺助剂。

4.3 方法验证

选用任何分析方法最好都经过验证,包括专属性的评估,灵敏度(检测限和定量限)、准确性、精密度、范围以及线性检验^[21]。验证范围最好在分析样品期望值的附近。当然,把数值定在分析样品可接受的标准的上限是合理的。

5. 取样/分析方法回收率

取样方法的选择必须把分析方法和取样方法所取得的样品的回收率结合起来考虑。这是很典型的实验室研究,把添加目标残留物加在一个模型的表面,用取样方法在该表面上取样,用分析方法测定残留物^[22]。测得的残留物量与添加在模型表面的量做比较,得到回收率。假如回收率大于 80%,则认为良好;假如大于 50%,则认为可接受。分析值需经回收率转换,因此希望能够得到尽可能高且稳定的回收率。

微生物控制问题

1. 清洁中的问题

GMP 要求生产工艺要适当地限制不该有的微生物出现在未灭菌和已灭菌的医药产品中,这应该理解为包括微生物数量和微生物种类。保护下一步生产的产品不受微生物污染,可以通过有效的清洗、分开消毒和(或)储存方法来达到。许多情况下,有效地控制微生物可以用良好的水溶液清洗方法。清洁条件可以是物理地除去微生物,或用热的碱性或酸性水溶液破坏微生物。用于去除变性的蛋白质的次氯酸盐,也是一种有效的氧化杀菌剂。假如单纯清洗不足以减少微生物,那么就需要用化学消毒剂或高温(蒸汽或热空气)。化学消毒剂包括过氧化氢、过氧酸、季铵盐氯化物,以及酒精;一般苯酚类的消毒剂不能用于设备清洗,因为很难从设备表面冲洗下来。假如消毒剂留下残留物,那么应该考虑最后一次冲洗能将残留物降到可接受限度。已清洗的设备其微生物可接受限度应根据在下一步生产的产品特点而定。非无菌产品的限度可以按照非无菌产品的微生物可接受限度。这种预测结果通常会导致可接受限度明显超过常规的良好清洁能达到的水平。用于最终灭菌产品生产的设备,其表面限度通常采用产品灭菌允许的最大生物负载;用于无菌产品生产的设备,其表面限度通常采用设备灭菌允许的最大生物负载。

2. 存放的问题

设备清洁的一个主要管理问题是,不合适的存放可能

导致微生物繁殖,如潮湿的环境或有水池。最好的办法是在长期存放设备以前有效地干燥设备。另一个办法(但并不是一个好办法)是在设备存放后和下一次使用前,再进行一次清洗和(或)消毒。假如用此方法,则在再次清洗消毒后,需测定化学与微生物残留物。

验证维持

一旦清洁过程经过合适的验证后,就应该保证清洁过程保持一致并且受到监控。采用的步骤包括常规监测、变更控制系统、培训以及再验证。

1. 监测

清洁过程常规监测的检验应该区别于 PQ 过程的合格检验。监测检验常用于每一次单独清洗后。检验方法应该能预示清洁系统失控或趋向于失控。可以监测清洁过程的参数有稀释后的清洁剂的浓度、清洁溶液的温度、各步工艺的时间、喷雾器的压力和流速、所用溶液的体积以及最后冲洗液的电导率。这些监测措施应该是清洁 SOP 的一部分,所以也应在三个 PQ 步骤中进行。有些监测检验能够提供通过/失败信息,这样就能清楚地预示清洁过程失控,对问题进行调查与改正。例如,喷雾器的压力高于规定压力,提示可能喷嘴堵塞,导致清洁范围不够。这就要求立刻调查设备是否充分清洗。设备不能再使用,直到确定设备已充分清洗,压力过高的原因已改正。另外,手工监测最后冲洗液的电导率或 TOC 不一定显示清洗不充分,而是显示清洁不充分的趋势,此趋势如果持续下去的话就会变成清洗不充分。这就是监测作用的重要性和警戒线,也显示趋势控制图的重要性。在某些情况下可能需要重复 PQ 过程中的全部检测。然而,验证的重要性是证明清洗过程前后的一致性,监测的重点应该是检验方法,这种方法能显示过程是否有改变。

2. 变更控制

被验证的清洁工艺应该服从控制方法的变更,包括计划中和计划外的变更。比如计划外的变更包括运行泵失效、喷雾器堵塞以及清洁剂供应中断等。变更控制方法的关键是评估变更的效果、改正变更项目(如果可能的话),需要的话要增加监测,以及把变更的工艺写成文件。例如,在线清洁滑行器的泵失效可能只需要一个相同的开关、新泵的 IQ、新泵的 OQ 并予以适当的文字化。喷雾器堵塞可能需要清洗喷雾器,并调查堵塞的原因。然后提出防止措施,比如安装过滤网去除可能引起堵塞的物质,以及进行一些防护性的维护保养措施以定期清洗过滤网和检查喷雾器。以上两种情况,都无需重复进行 PQ。另外,清洁剂组成的微小变化,就需要实验室研究证明其等效性,然后再进行依次 PQ 以证明其等效性。生产工艺本身变化以及这种变化对设备清洁的影响,在考虑变更清洗过程的控制方法时绝不能忽视,如升高工艺温度会改变污染物性质,使污染

S

更难清洗。在所有情况下都必须根据变更控制方法后的 SOP 写出变更文件。

3. 培训

在清洁 SOP 中, 操作人员的培训是维护验证的重要部分, 尤其是人工清洁。人工清洁的培训方法应该包括教室讨论, 观察受过培训的操作人员对 SOP 的执行情况, 然后让受训者执行 SOP 以考察其熟练程度。修订 SOP 后也需要培训, 当操作人员因操作错误引起任何偏差时都应该进行再培训。

4. 再验证

对验证过的清洁工艺进行再验证有两种情况: 一是有重大变化的需再验证。“重大”是专业判断。然而清洁方法的改变, 如人工清洗改成自动清洗, 即使清洁剂和工艺参数没有变化, 通常也需要再验证, 本质上这并非真正的再验证, 而是新的清洁工艺验证。二是建立常规检查的再验证, 它评估清洁过程的一致性和清洁过程控制情况, 以证明清洁过程依然受到控制。这种周期性的再验证时间应该在清洁验证指南中详细描述 (如清洁验证总计划), 通常是每年或每两年一次。这种周期性再验证包括数据监测、方法变更、清洁过程偏差以及设备清洁后产品的质量记录。假如数据监测足够、控制方法的变更很小、所有偏差都找到了正确的原因, 并且产品没有与清洁有关的质量问题, 那么就说明清洁过程依然受到控制。在这种情况下, 可以在再验证报告中记录其结果并且得出结论——清洁过程依然受到控制, 原始的验证依然适用。另外, 如果监测数据显示存在需要改正的趋势, 如果进行了多项个别改变 (每个都被接受) 但整体清洁过程有了明显不同, 如果清洁过程的偏差并未找到原因或原因未被纠正, 以及 (或) 产品质量与清洁过程有关时, 那么调查的结果指出需要重复进行一次或多次 PQ。这种情况下, 在执行 PQ 之前, 经常需要进行实验室或中试评估。

参考文献

- Current Good Manufacturing Practice in Manufacturing, Processing, Packing, or Holding of Drugs: General, 21 CFR210, 1 April 1997 (revised).
- Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals, 21 CFR 211, 1 April, 1997 (revised).
- Harder, S. W. The Validation of Cleaning Procedures. *Pharm. Technol.* 1984, 8 (5), 29-34.
- Mendenhall, D. W. Cleaning Validation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1989, 15 (13), 2105-2114.
- FDA. Guide to Inspections of Validation of Cleaning Processes; FDA Office of Regulatory Affairs; Rockville, MD, 1993.
- United States vs. Barr Laboratories, 812F, Supp. 458 (DNJ 1993).
- FDA. Mid-Atlantic Region Inspection Guide: Cleaning Validation, July 28; 1992.
- FDA. Guide to Inspections of Validation of Cleaning Processes; FDA Office of Regulatory Affairs; Rockville, MD, 1993.
- FDA. Current Good Manufacturing Practice: Proposed Amendment of Certain Requirements for Finished Pharmaceuticals; Federal Register, 1996; 61, 20103.
- Recommendations on Cleaning Validation. Document PR 1/99-2. Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme; Geneva, Switzerland, 1 April, 2000.
- Draft 4 of Annex 15 to 1997 EU Guide to Good Manufacturing Practice—Eudralex Volume 4, Validation Master Plan/Design Qualification/Installation and Operational Qualification/Non-Sterile Process Validation/ Cleaning Validation, European Commission, Working Party on Control of Medicines and Inspections, 17 September 1999. <http://dg3.eudra.org/pharmacos/docs/doc99/GMPanx15.pdf> (accessed September 2000).
- Cleaning Validation Guidelines, Health Canada Therapeutic Products Programme, 1 May, 2000. http://www.hc-sc.gc.ca/hpb-gps/therapeut/zfiles/english/guides/validate/validation_guide_e.pdf (accessed September 2000).
- ICH Steering Committee, Draft Consensus Guideline; Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients, 19 July, 2000. www.ifpma.org/pd-fifpma/Q7Astep2.pdf (accessed September 2000).
- PhRMA Quality Committee, Bulk Pharmaceuticals Working Group. PhRMA Guideline for the Validation of Cleaning Procedures for Bulk Pharmaceutical Chemicals. *Pharm. Technol.* 1997, 21 (9), 56-73.
- Good Manufacturing Practice Guide for Bulk Pharmaceutical Excipients. International Pharmaceutical Excipient Council; Arlington VA, 1995.
- FDA. Guide to Inspections of Validation of Cleaning Processes; FDA Office of Regulatory Affairs; Rockville, MD, 1993.
- FDA, Guideline on General Principles of Process Validation, May 1987. <http://www.fda.gov/cder/guidance/pv.htm> (accessed September 2000).
- Fourman, G. L.; Mullen, M. V. Determining Cleaning Validation Acceptance Limits for Pharmaceutical Manufacturing Operations. *Pharm. Technol.* 1993, 17 (4), 54-60.
- LeBlanc, D. A. Establishing Scientifically Justified Acceptance Criteria for Cleaning Validation of Finished Drug Products. *Pharm. Technol.* 1999, 23 (10), 136-148.

20. FTIR. com, Cleaning Validation and Coat Weight Analysis., <http://www.ftir.com/remspec/grazing05html.htm> (accessed September 2000).
21. Kirsch, R. B. Validation of Analytical Methods Used in Pharmaceutical Cleaning Assessment and Validation. Analytical Validation in the Pharmaceutical Industry (Suppl. to Pharm. Technol.) 1998, 22 (10), 40—46.
22. Kirsch, R. B. Validation of Analytical Methods Used in Pharmaceutical Cleaning Assessment and Validation. Analytical Validation in the Pharmaceutical Industry (suppl. to Pharm. Technol.) 1998, 22 (10), 40—46.

进一步阅读

Bismuth, G.; Neumann, S. Cleaning Validation: A Practical Approach; Interpharm Press; Denver, CO, 1999.
Brunkow, R.; Delucia, D.; Haft, S.; Hyde, J.; Lindsay,

J.; McEntire, J.; Murphy, R.; Myers, J.; Nichols, K.; Terranova, B.; Voss, J.; White, E. Cleaning and Cleaning Validation: A Biotechnology Perspective; PDA; Bethesda, MD, 1996.

LeBlanc, D. A. Validated Cleaning Technologies for Pharmaceutical Manufacturing; Intepharm Press; Denver CO, 2000.

Points to Consider for Cleaning Validation; PDA Technical Report No. 29; Bethesda, MD, August 1998.

Verghese, G. Developing a Validatable Cleaning Process. Proceedings of the 1999 Interphex Conference; New York, April 20—22, 1999; Reed Exhibition Companies; Norwalk CT, 1999; 461—469.

(傅 民 洪赞飞 译)

Clinical Research, Amgen Inc., Thousand Oaks, California, U. S. A.

P' col: 药理学; r-DNA: 重组脱氧核糖核酸

通过生物技术得到的产物也被称为生物产品，原始蛋白质是从人体分离的或自体内与人生理系统相互作用产生的。60 种商业化产品中约 50 种是蛋白质。蛋白质是复杂的大分子，有几个关键的结构特征，这是其有活性的根源。每种蛋白质在性质上务必保持完整，由 20 种氨基酸在特定的氨基酸顺序下构成。特殊的结构特征包括二硫键、特殊

的末端氨基酸种类、糖基化（碳水化合物连接到蛋白质骨架上）和三维立体构象。

1. 重组 DNA 技术

20 世纪八九十年代生物技术的主导技术是重组 DNA 技术，由此创造出 35 余种产品，约占生物技术商业化产品的 60%。重组 DNA 技术有 5 个步骤：①蛋白质鉴别；②基因分离；③克隆和表达；④生产（放大过程）；⑤蛋白质质量确认和过程的完整性（表 1）。

表 1 重组 DNA 技术

步骤 1	蛋白质鉴别 蛋白质分离 生物特性描述 蛋白质测序
步骤 2	基因分离 核苷酸编码及氨基酸序列 mRNA 分离，逆转录酶和互补 DNA 基因库的 DNA 探针
步骤 3	克隆和表达 人基因插入质粒 质粒置入宿主细胞 宿主细胞产生蛋白 细胞库
步骤 4	中试放大 接种 发酵或细胞培养 蛋白质纯化 剂型研究
步骤 5	质量保证 基因测试 批量产品测试 工艺验证 最终产品测试

重组 DNA 技术步骤①为寻找在人体内负责某些生物学效应的且有治疗潜力的蛋白质。蛋白质需要在其正常的环境下，通常是从体液和细胞中分离。测定包括氨基酸顺序、糖基化（碳水化合物组成）、二硫键以及可能的三维立体构象等蛋白质的结构。

重组 DNA 技术步骤②需要分离对蛋白质负责的人体基因。首先，如果我们知道了这个蛋白质的氨基酸全序列，我们就知道编码 20 种氨基酸的 64 种核苷酸三联体，我们就可以构建许多能代表目的蛋白质的三联体密码组合。这些遗传组合就是基因，通过筛选鉴别出其中一个基因能产生目的蛋白。其次，我们也许有能力去发现产生目的蛋白质的人体细胞。在这种细胞中能找出负责通过翻译过程生产目的蛋白质的信使 RNA（mRNA）。病毒逆转录酶能从这一特定的 mRNA 产生目的互补 DNA。这种方法用于发现胰岛素基因，致使该产品上市。第三，人体基因可以用核苷酸探针从人体染色体中找到，这是一项复杂的、令人

生畏的工作。在这项方法中，我们鉴别了蛋白质中各多肽的氨基酸序列。利用氨基酸三联体密码构建每个多肽的核苷酸组合（探针）。然后将染色体（30 亿~40 亿核苷酸对）截断成数以千计的 DNA 片段。通过一连串实验，我们试着将第一种核苷酸探针和 DNA 混合物配对，从而创设一个 DNA 片段库（几百个或几千个片段）。在另一系列实验中，用第二种不同的探针来筛选 DNA 片段库从中寻找配对。如果找到配对有可能发现一系列基因。每种基因必须对基因产物蛋白质通过遗传学进行评价，通过试验证实该蛋白质与天然蛋白质相比具有同样的结构特征以及在定向实验中有药理学特性。

重组 DNA 技术步骤③包括基因克隆和基因的蛋白质表达。克隆是在非人体细胞中目的人体基因的复制。表达是指在含有人体基因的非人体细胞中生产目的人体蛋白质。这些过程需要一个载体将 DNA（基因）携带进入细胞。细菌质粒是一个环状 DNA，能够在细胞（载体）间转移，接受人体基因插入，并允许转移该人体基因。质粒必须用专一的酶（限制性内切酶）切开去接受人体 DNA（基因），每一种酶对某种核苷酸序列是特异的，切开后得到的质粒能与入基因末端相配。被打开的细菌质粒和人体基因的这些“黏性”末端通过连接酶的作用进行 DNA 重组，结果形成一个人体基因插入到细菌质粒中的重组 DNA 分子。接着重组 DNA 分子转移进入宿主细胞用来生产其携带的人体基因所表达的蛋白质。宿主细胞须具有的重要特征是：生殖周期短、在体外有长时间的生存力、能接纳细菌质粒、蛋白质生产能力强以及始终不变地生产人体蛋白质。在实验室开发出的这种独特的新细胞及其子代被称为主工作细胞库。

重组 DNA 技术的步骤④是放大生产，包括 4 个阶段：接种、发酵、纯化和制剂。接种阶段需要使用从新宿主细胞（主工作细胞库）来的子代细胞，子细胞储存在 -70℃ 冷冻箱中，子细胞生长在一系列类三角瓶中的特殊培养基中，测试其正常生长条件。生长培养基是一种独特的无机盐和化合物的特定混合物，能提高细胞在体外的活力（使用期）并有助于细胞产蛋白质的能力。发酵或细胞培养阶段需要接种上千瓶接种阶段的细胞或大发酵罐的细胞，并添加生长培养基。宿主细胞生产的蛋白质，对细菌作宿主的细胞而言是在胞内的，而哺乳动物细胞则是在胞外的。蛋白质纯化应按细菌和哺乳动物系统之间的差异而有所不同。对细菌而言，细胞从发酵罐中取出呈细胞悬液，然后离心从细胞中得到蛋白质。然后蛋白质混合物经提取加工，通常利用高压液相从其他蛋白质中分离目的蛋白质。对哺乳动物细胞，则定期收集含蛋白质的培养液，然后再补充培养基继续培养。提取方法基本上是相同的。纯化获得一批纯的蛋白质。最后阶段是制剂，通常加进液体、稳定剂和无机盐能很好地调和达到蛋白质的最佳稳定性和最长保存期。一般由于蛋白质微妙的特性以及伴随而来的众多降解过程致使蛋白质制剂鱼目混杂。大多数小瓶装生物产品是不含保存剂的蛋白质，因为它们和蛋白质会有反应性。从这里讲到的重组 DNA 技术可以看出，生产是多面性的而且很复杂。

S

重组 DNA 技术的步骤⑤是最终产物、成分和整个制造过程工艺的质量控制。蛋白质是相当复杂的分子，而且它的生产也很复杂，由于这两方面导致有很大的降解、改性或污染的可能性。蛋白质的破坏能在许多过程中发生，列举在表 2 中。药物生产的典型方法，如微生物或化学法，以及遗传物质使用后通过致癌的或病毒的 DNA 的掺入或变更都可能引起污染。因此通过一系列实验进行质量控制保证最终产品的质量，其中包括 4 个方面：遗传物质（质粒和基因）、批量蛋白质产物、最终产物和生产过程。典型的实验如表 3 所示。

表 2 生物产品——稳定性和降解

沉淀
凝集/凝聚
交联
断裂（二硫键）
氨基酸缺失
糖基化/去糖基化
结合
氨基酸去除/添加
还原
氧化
蛋白质的折叠/解折叠
脱氨基化
蛋白酶解
蛋白质包含
末端氨基酸变化

表 3 rDNA 技术的质量控制

- | |
|--------------------|
| 1. 遗传物质（5~10 项试验） |
| 染色体组型分析 |
| 肿瘤基因筛选 |
| 基因稳定性 |
| 感染 DNA 筛选 |
| 2. 大量蛋白质产品（20 项试验） |
| 氨基酸序列 |
| 多肽测序 |
| HPLC |
| 放射免疫 |
| 蛋白质印迹色谱法 |
| 生物分析 |
| 3. 工艺验证（10 项试验） |
| 蛋白质收率 |
| 蛋白质攻击 |
| 内毒素参加（示踪剂） |
| 4. 最终产品（30 种试验） |
| 蛋白质分析（重复第二部分测定） |
| DNA 污染 |
| 稳定性试验 |
| 冻干-解冻测试 |

2. 单克隆抗体制备

单克隆抗体是具有统一基本结构的复杂蛋白质，包含 2 对配对蛋白质的 4 个亚基，分别称为重链和轻链。单克隆抗体是一种在人体由血浆细胞针对个别抗原的外源物而产生的高度特异性蛋白质。历史上生物技术中的单克隆抗体是在小鼠中产生的，目标针对人体抗原。我们正在开发一个攻击和消去这些靶抗原的产品（单克隆抗体）。小鼠针对人体抗原（靶）产生高度特异性的单克隆抗体，但是在大量小鼠中得到的单克隆抗体还是极微量的。生物技术单克隆抗体利用骨髓瘤细胞和小鼠浆细胞融合产生鼠的杂交细胞。骨髓瘤细胞给予杂交细胞几个特性，即单克隆抗体的高产量和长寿命，这使得单克隆抗体工业化生产有了可行性。这些杂交细胞是大量生产特殊靶单抗的新主细胞。但是人对鼠单抗的蛋白质有排斥反应，因此鼠源的单抗有很大的局限性。鼠单抗有两个限制：有毒的人抗体鼠抗原应答带来发热和发寒，以及鼠单抗与靶细胞结合能力差，这些影响到鼠单抗的活性。因此，科学家用人抗体亚基代替 4 个鼠亚基创造出部分是鼠的和部分是人的嵌合分子操纵单抗，这种入源化可以减低毒性和提高活性。目前已有 8 种单克隆抗体有效地用于治疗炎症或与蛋白质结合阻止肾移植患者的排斥反应。

3. 基因技术

在药物发现和开发中，基因材料（DNA、mRNA、基因以及 RNA 酶）成为前沿，更确切地说，成为生产发现的首要工具。3 大基本领域包括：反义技术、基因治疗技术和染色体组学。反义就是与疾病病理中有关的异常或变异 mRNA 分子互补的一个 RNA 分子。反义 RNA 分子与有害的 mRNA 分子结合防止疾病的发生。Fornivirsen 就是这样的产品，用于治疗与艾滋病患者视网膜炎相关的巨细胞病毒。

基因治疗是一种用基因作为治疗剂治疗疾病的技术。基因治疗的潜在目标包括替换失活基因、再激活失活基因、阻断致病基因（如致癌基因）、启动保护基因或加一个基因提高细胞特性（如增强癌细胞对化疗药物的敏感性）。基因治疗开发所面临的挑战包括寻找致病的或需增强的靶基因，鉴别最适于附加基因插入的靶（人），附加基因能确定地插入（传递）到细胞中，以及基因能在适当的生理方式下表达（活性范围和持久性）。我们正加快分离和鉴别人基因组中所有的基因，但是基因送递的可靠性及可重复性尚未达到可用于常规治疗的程度。

基因组学是一项寻找人体内负责某些过程或产物的基因技术。这个基因可能在促进药物或生物产物开发方面提供新方法或疾病靶。例如，细胞长寿基因的发现导致了蛋白质端粒末端转移酶的发现。端粒末端转移酶负责在所有染色体的末端添加短核酸序列端粒，保护染色体避免变异和细胞死亡。另外，基因组学的研究导出了一个基因，它产生一种蛋白质可用作治疗剂。例如，骨保护素（osteop-

rotogerin), 它是一种关键蛋白质, 是一种自然物质, 能阻止破骨细胞捣毁骨质导致的骨质疏松症。基因组学要求收集包括蛋白质和多肽、蛋白质或药物活性相关的受体, 以及药物活性机制和与生理、药理作用相关的药物、蛋白质、RNA 或 DNA 的亚基等的大量人基因组和遗传学信息。信息科学现在实际上是分享、整合和操纵大量的情报去创造新产物。

生物学方法

1. 聚合酶链式反应

聚合酶链式反应 (PCR) 是生物技术中的一项核心技术, 能使微量遗传物质的扩增成为可能。这个方法首先包括用高温使 DNA 变性, 也就是解旋 DNA 双螺旋使其遗传密码能被阅读和复制; 接下来, 一段 DNA 前导序列被用来对特定点进行遗传密码的初读, 并且 DNA 螺旋和 DNA 链两者都能阅读; 第三, DNA 聚合酶催化遗传密码的阅读。按这三步顺序重复, 遗传物质得到扩增, 若重复 20 次可使 DNA 增加数以百万倍。

2. 高通量筛选

高通量筛选 (HTS) 是欲从大量的遗传物质或多肽分子中更快地获得更高质量的产物。HTS 将筛选活性的分子数提高了 10~1000 倍。HTS 方法依赖于分析方法的提高、设备的小型化以及自动化。目前, 一天能检测 100 000 个以上的样品。

3. 组合化学

组合化学包括利用基本结构单元, 用 20 种氨基酸或 4 种核苷酸来构建新分子。一组结构单元的所有不同组合被建立, 像 10 种氨基酸能产生超过 350 万个化合物。庞大的化合物库的建立需要通过 HTS 筛选并利用信息学来帮助整理出所有新化合物的结构和功能。

4. 细胞治疗

一项较新的治疗疾病的技术建立在从一种特定组织中获得健康细胞后筛选具有某种合意性质的细胞小集团, 然后通过活体外操作提高这些细胞的活性的基础上。然后将这些特定选择、提高和激活过的细胞再注回到那些细胞不是在足够起作用的患者体内, 从而改善疾病。例如, 从一名膝盖严重受伤而恢复较差的患者膝盖中取到负责软骨生长的 chondrocyte 细胞, 这些 chondrocyte 细胞在活体外操作后再注回到患者身上使软骨生长恢复正常。从外周血液、骨髓细胞或脐带血液中收集到骨髓祖细胞, 经不同的细胞标记处理后可选出最具新生潜力的细胞, 例如, 癌症患者在化疗以后骨髓几乎全受到损伤, 可用这些祖细胞帮助患者促进骨髓新生和白细胞再生, 从而防止感染。另外, 新生的皮肤收集后放在一种利于真皮和表皮生长的三维支

架中, 这种支架将来可用于加速腿静脉溃疡伤口的愈合, 从而利于该疾病的治疗。

5. 生物制品的分子操作

新一代生物制品是现存分子的衍生物, 通过改变它们的性质而得到的新分子。PEG 化就是将聚乙二醇 (PEG) 加到蛋白质结构上去的一种方法, 这种方法正应用于 α -干扰素。PEG 的添加可以延长产品的半衰期和作用的持久性, 也能保持分子所希望的活性。

糖基化是将一种碳水化合物 (如唾液酸) 加到蛋白质的氨基酸主链上的方法。某些蛋白质的结构修改后, 如 (人) 促红细胞生长素 (α -epoetin) 可以延长半衰期并保持其药理特性。

生物制品分类

从 1982 年到 1999 年, 美国 30 多家公司上市了 60 多种生物制品。在许多疾病方面, 生物制品常有重大的突破, 对那些以前无法治疗的疾病提供一流的治疗, 如治疗囊性纤维变性症的链道酶 (dornase) 以及治疗多发性硬化症的 β -干扰素。现在 Amgen 公司已有 10 多种的生物制品。

1. 激素

3 种自然存在的蛋白质基激素——胰岛素、生长激素 (somatotropin) 和卵泡刺激激素 (促卵泡素, follitropin) 通过 DNA 重组技术复制开发成 11 种产品 (表 4)。胰岛素是第一个生物技术产品, 于 1982 年获得批准, 现有 2 个产品。一个母分子能产生一个以上的产品, 每个分子可能有关联但适应证不同。这是因为可以对分子进行巧妙的操作。例如, 改变末端氨基酸而不影响蛋白质的生物活性, 这可以在不影响蛋白质功能的前提下实施。市场上有 7 种生长激素产品。相似的产品由不同公司生产常常产品的通用名不同。例如, 在 Organon 公司称为 β -follitropin, 而在 Ares-Serono 则称为 α -follitropin。每个获得批准的生物产品包括了通用名和商品名称、产品上市的公司和治疗应用范围 (表 4)。

表 4 批准的生物制品——激素

通用名	商品名	治疗领域
人胰岛素	Humulin (Eli Lilly)	胰岛素依赖型糖尿病
	Novolin (NovoNordisk)	
人生长激素	Protropin (Genentech)	生长素缺乏症
	Humatrope (Eli Lilly)	慢性肾病引起的生长迟缓
	Nutropin (Genentech)	AIDS 病引起的消瘦
	Saisen (serono)	
	Serostim (Serono)	
	Gentropin (General Bio-technology)	
	Norditropin (NovoNordisk)	

续表

通用名	商品名	治疗领域
β 促卵泡素 (FSH)	Follistim (Organon)	排卵障碍
α 促卵泡素 (FSH)	Gonal-F (Ares-Serono)	排卵障碍
生长激素释放激素	Geref (Serono)	儿童生长激素缺乏

2. 干扰素

3种被称为干扰素的蛋白质由人体内许多细胞产生, 并用来防御外来感染物质, 并为人体提供保护。干扰素有各自的有益特性, 如刺激免疫系统和具有溶细胞的活性。干扰素家族有三类, 即 α 、 γ 、 β , 共有8种产品(表5)。干扰素的适用症很广, 包括肿瘤学(如恶性黑色素瘤和慢性髓细胞白血病)、病毒感染(如丙型肝炎)和免疫疾病(如多发性硬化)。

表5 批准的生物制品——干扰素

通用名	商品名	治疗领域
α -干扰素	Wellferon (Glaxo Wellcome)	慢性丙肝
α -2a 干扰素	Roferon-A (Hoffmann-La Roche)	毛细胞白血病; AIDS-相关型卡波西肉瘤; 慢性髓细胞白血病
α -2b 干扰素	Intron A (Schering-Plough)	毛细胞白血病; AIDS-相关型卡波西肉瘤; 慢性乙肝和丙肝; 尖锐湿疣; 恶性黑色素瘤; 非霍奇金淋巴瘤
α -n3 干扰素	Alferon N (Interferon Sciences)	尖锐湿疣
γ -1b 干扰素	Actimmune (Genentech)	慢性肉芽肿病
β -1b 干扰素	Betaseron (Berlex)	急性复发-弛张性多发性硬化症
β -1a 干扰素	Avonex (Biogen)	急性复发-弛张性多发性硬化症
α -con-1 干扰素	Infergen (Amgen)	丙肝(首发和复发)

一种药物分子最初的产品获得批准以后经常会增加适应证。 α -干扰素就是在这种药物开发过程中的一个很好例子。在1986年, 它的第一种适应证是毛细胞白血病, 接着附加了7种用途。每种用途都需要广泛的临床实验(II期和III期临床)。

3. 生长因子和白细胞介素

这类蛋白质可分成三类: ①血细胞生长因子(GFs),

也就是通常研究的集落刺激因子(CSFs); ②组织生长因子; ③白细胞介素(白细胞介素能帮助细胞间的传达)。世界范围内有8种可利用的CSFs: filgrastim、sargramostim、molgramostim、regramostim、lenograstim 和 nartograstim 等。这些产品刺激白细胞的生成及活动。Epoetin 产品(α -epoetin 和 β -epoetin)通过刺激红细胞生成来逆转贫血。血小板生长因子(Becaplermin)是一种表皮组织生长因子, 用于加速糖尿病患者的伤口愈合(表6)。

表6 批准的生物制品——生长因子和白介素

通用名	商品名	治疗领域
α -红细胞生成素	Epogen (Amgen) Procrit (Ortho Biotech)	慢性肾病引起的某些贫血; 齐多夫定诱导的贫血; 癌症化疗; 外科患者的贫血
粒细胞集落刺激药 (r-metHug-CSF)	Neupogen (Amgen)	骨髓抑制剂化疗引起的中性粒细胞减少症; 骨髓移植后的骨髓恢复; 严重的慢性嗜中性粒细胞减少症; 外周血祖细胞移植; 急性成巨核细胞性白血病中的吸入和巩固治疗
重组细胞集落刺激因子 (r-HuGM-CSF)	Leukine (Immunex)	骨髓移植后的骨髓恢复; 骨髓移植障碍; 急性成巨核细胞性白血病化疗的辅助物
血小板生长因子(PDGF)	Regranex (Ortho-McNeil)	糖尿病脚部溃疡
阿地白介素(IL-2)	Proleukin (Chiron)	转移的肾细胞癌; 转移的黑素瘤
奥普瑞白介素(IL-11)	Neumega (Genetics Institute)	化疗引起的小血小板减少症

2种白细胞介素用于肾细胞癌(IL-2)和血小板减少(IL-11), 这些产品对相当多器官特别是心血管有毒性。

4. 单克隆抗体

20世纪90年代后期, 单克隆抗体迅速发展, 有6种产

品获得批准用于广范围适应证。除了肾移植外, 新的用途有防止血液凝集、转移性乳腺癌、非霍金氏淋巴瘤、局限性回肠炎和儿童病毒性肺炎。有重要新适应证产品的发展是以鼠抗体的人源化为基础的, 这可使副作用减少, 同时与靶受体亲和力更好(表7)。

表 7 批准的生物制品——单克隆抗体

通用名	商品名	治疗领域
曲妥珠单抗	Herceptin (Genentech)	转移的乳腺癌 (Her 2 Neu ⁺)
帕利佐单抗	Synagis (MedImmune/Abbott)	预防儿童呼吸合胞体病毒和致命性肺炎
英夫利昔单抗	Remicade (Centocor)	局限性回肠炎
莫罗单抗-CD3	Orthoclone OKT 3 (Ortho Biotech)	肾移植患者的急性同种移植排斥; 心脏和肝脏移植排斥
阿昔单抗	ReoPro (Centocor/Eli Lilly)	经皮冠状动脉内成形术 (PTCA) 后预防血块, 经皮冠状动脉内成形术前不稳定心绞痛
利妥昔单抗	Rituxan (IDEC/Genentech)	低级别非霍奇金淋巴瘤
达克珠单抗	Zenapax (PDL/Roche)	肾移植, 急性排斥
巴利昔单抗	Simulect (Ligand/Novartis)	急性器官移植排斥

5. 酶和血液凝聚因子

20 世纪 80 年代后期开发出的首个蛋白酶是组织纤维蛋白溶酶原激活剂 (t-PA), 用于减轻急性心肌梗死中的血液凝固。针对类似适应证接着又开发出了 3 种酶。对囊性纤维

变性性开发出一种独特的酶 (链道酶 dornase), 这种酶的缺失导致这种灾难性疾病的发生。血液因子 (F7、F8、F9) 与正常血液凝固关系密切, 它们的缺失导致出血不正常, 若用这些重组 DNA 蛋白质补偿方法可以完全矫正 (表 8)。

表 8 批准的生物制品——酶和血液因子

通用名	商品名	治疗领域
阿替普酶	Activase (Genentech)	急性心肌梗死; 肺栓塞; 脑卒中
阿法链道酶	Pulmozyme (Genentech)	囊性纤维变性的突发呼吸系并发症
重组伊米苷酶	Cerezyme (Genzyme)	1 型戈谢氏病
瑞替普酶	Retease (Centocor)	急性心肌梗死
依替巴肽	Integrelin (Cor/Schering)	急性冠状动脉综合征; 血管成形术
盐酸替罗非班	Aggrastat (Merck)	急性冠状动脉综合征
F7	Novo-Seven (NovoNordisk)	血友病 (F7 缺乏)
F8	KoGENate (Bayer); Recombinate (Baxter)	A 型血友病
F9	Benefix (Genetics Institute)	B 型血友病

6. 其他生物制品

表 9 列出了各种有独特适应证的不同类型制品。有 2 种疫苗用于治疗乙型肝炎和莱姆病, 以及用于抗癌和抗真菌的 5 种脂质体制剂。细胞治疗包括收集人体细胞或组织, 在活体外培养, 然后将它们回输入患者体内以治愈损伤的组织, 如伤口愈合和软骨挫伤。透明质酸用于手术, 放在

组织间或周围防止粘连。一种反义分子 (fornivirsen) 用于治疗巨细胞 (CMV) 视网膜炎。用依那西普阻断破坏性的肿瘤坏死因子, 改善风湿性关节炎的治疗。白介素 2 和一种毒素结合形成一种融合分子用以治疗罕见的皮肤癌。一种 4 个氨基酸的多肽 (glatiramer) 用于治疗多发性硬化症。一种生物载体 (糯米纸, wafer) 用于患脑肿瘤时服用抗癌药物卡氮芥 (BCNU)。

表 9 批准的生物制品——其他

通用名	商品名	治疗领域
乙型肝炎疫苗	Engerix-B (SmithKline Beecham) Recombivax HB (MSD)	乙肝预防
莱姆 (氏) 病疫苗	LymErix (SKB)	莱姆氏病预防
阿霉素脂质体	DOXIL (Alza)	卡波西肉瘤
两性霉素脂质体	Abelcet (Liposome) Amphotec (Alza) Ambisome (Gilead)	曲霉菌感染 系统性真菌感染

续表

通用名	商品名	治疗领域
柔红霉素脂质体	DaunoXome (Gilead)	卡波西肉瘤
卡氮芥-聚合物	Gliadel (Guilford)	复发的多发性成胶质细胞
透明质酸膜	Seprafilm (Genzyme)	外科手术后防止粘连
透明质酸凝胶	Adcon-L (Gliatech)	腰部手术后防止粘连
格拉默	Copaxone (Teva/HMR)	复发性多发性硬化症
软骨培养服务	Carticel (Genzyme)	膝部 cartilage 损伤
皮肤移植产品	Apligraf (Organogenesis/Novartis)	腿部静脉曲张的伤口治愈
反义寡核苷酸 (Vitravene)	Fornivirsen (Isis)	巨细胞病毒视网膜炎
依那西普 (Etanercept)	Enbrel (Immunex)	类风湿性关节炎
地尼白介素-毒素连接物	Ontak (Ligand)	皮肤 T 淋巴细胞瘤

制剂组方和配送的问题

大多数生物制品 (75%) 是蛋白质, 如前所述它是一种大而复杂的精细分子。但是值得注意的是蛋白质可由多种机制遭破坏, 更有甚者, 最后一步制剂时通常对温度很敏感, 会引起沉淀。因为稀释时生物制品可能存在不利的稳定性变化, 所以对稀释剂有限制条件。蛋白质制剂通常不含保存剂, 由于它们会和蛋白质反应, 因此这类制剂都用一次性使用的小瓶装。通常需要冷藏来确保较长的保存期。在使用前, 药瓶必须加温至室温以减少局部反应。

产品的发展

人们希望将来生物技术有更多产品获得批准。2000 年有 700 多种分子在进行临床研究, 而更多地在进行基础研究。在美国大约有 1250 家生物技术公司每年投资 100 亿美元用于研究。开发的产品种类繁多, 其中单克隆抗体和疫苗是最大的种类 (表 10)。治疗的领域包括大多数疾病, 而癌症方面的应用是最主要的研究领域 (表 11)。

表 10 研发中的产品种类

反义 9	干扰素 12
细胞疗法 20	白细胞介素 9
凝固因子 3	单克隆抗体 74
集落刺激因子 3	核苷酸类似物 3
红细胞生成素 3	信号系统 3
融合蛋白 3	可溶性受体 3
基因疗法 38	组织纤溶酶原激活 3
生长因子 21	疫苗 77
生长激素 5	其他 58

表 11 研究的疾病

艾滋病/免疫缺陷病毒 29	心脏疾病 28
自身免疫疾病 29	感染性疾病 36
血液病 8	不育症 4
癌症 151	神经系统疾病 26
糖尿病 13	呼吸道疾病 20
消化疾病 9	皮肤疾病 14
眼睛疾病 3	移植 14
遗传障碍 10	其他疾病 22
生长障碍 4	

这些生物产品正由多家生物技术公司进行评价, 另外还有 32 家公司每家至少已上市一个品种 (表 12)。1999 年按销售额排序前 10 位的是 Amgen、Genentech、Chiron、Genzyme、Biogen、Agouron、Centocor、Immunex、Nabi 和 MedImmune。

表 12 生物技术公司

Alza	Immunomedics
Amgen	Immunex
Advanced Tissue Sciences	Interferon Sciences
Biogen	Ligand
Bio-Technology General	Liposome Company
Centocor	MedImmune
Chiron	Nabi
Cytogen	NeoRx
Enzon	Organogenesis
Genentech	Organon
Genetics Institute	Ortho Biotech
Gilead	Protein Diagnostics
Gliatech	Laboratory
Guilford	Seragen
IDEC	Serono
	Zymogenetics

参考书目

- Andrade, M. A.; Sander, C. Bioinformatics: From Genome Data to Biological Knowledge. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997, 8 (6), 675—683.
- Buckel, P. Recombinant Proteins for Therapy. *Trends Pharm. Sci.* 1996, 17 (12), 450—456.
- Bush, P. Pharmacotherapeutics of Biotechnology—Derived Products. *J. Pharm. Practice* 1998, 11 (1), 54—71.
- Carroll, W. L. Introduction to Recombinant-DNA Technology. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993, 58 (Suppl. 2), 249S—258S.
- Crooke, S. T. Antisense Therapeutics. *Biotechnol. Genetic Engineering Rev.* 1998, 15, 121—157.
- Demain, A. L. An Overview of Biotechnology. *Occup. Med.* 1991, 6 (2), 157—168.
- Evens, R. P.; Dinarello, C. A.; Browne, J.; Fenton, D. Biotechnology and Clinical Medicine: Part I. *Hosp. Physician* 1995, 31 (1), 27—36.
- Evens, R. P.; Dinarello, C. A.; Browne, J.; Fenton, D. Biotechnology and Clinical Medicine: Part II. *Hosp. Physician* 1995, 31 (2), 26—31.
- Georgiou, G. Recombinant DNA Technology. *Trends Biotechnol.* 1995, 13 (3), 79—80.
- Glossary of Terms, Biotechnology at Work. Biotechnology Industry Organization; 1625 K Street NW; Washington, DC, 1995; 2006.
- Kipriyanov, S. M.; Little, M. Generation of Recombinant Antibodies. *Mol. Biotechnol.* 1999, 12 (2), 173—201.
- Lipner, M. The Polymerase Chain Reaction: Amplifying its role in Research and Beyond. *Oncol. Times* Dec. 1992, 14—16.
- Mountain, A. Gene Therapy: The First Decade. *Trends Biotechnol.* 2000, 18 (3), 119—128.
- Myers, P. L. Will Combinatorial Chemistry Deliver Real Medicines? *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997, 8 (6), 701—707.
- Morrison, S. W.; Giovannetti, G. T. Biotech 99: Bridging the Gap, Ernst & Young's 13th Biotechnology Industry Annual Report 1998; Ernst & Young LLP; Palo Alto, CA, Dec. 1998.
- Muellner, S.; Neumann, T.; Löffspeich, F. Proteomics — A New Way for Drug Target Discovery. *Arzneimittel-Forschung* 1998, 48 (1), 93—95.
- Seamon, K. B. Specifications for Biotechnology-derived Protein Drugs. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1998, 9 (3), 319—325.
- Spurr, N.; Darvasi, A.; Terrett, J.; Jazwinska, L. New Technologies and DNA Resources for High Throughput Biology. *Br. Med. Bull.* 1999, 55 (2), 309—324.
- Survey, New Medicines in Development, Biotechnology Pharmaceutical Research and Manufacturers of America; 1100 15th St. NW; Washington, DC, 2006; 1—44, February 2000.
- Tami, J. A. The Major Techniques of Biotechnology. *J. Pharm. Practice* 1998, 11 (1), 28—37.
- Wiley, S. R. Genomics in the Real World. *Curr. Pharm. Design* 1998, 4 (5), 417—422.

(张 辉 译)

S

S

生物体液分析

Stephen G. Schulman

Judith A. Davis

Gayle A. Brazeau

University of Florida, Gainesville, Florida, U. S. A.

引言

生物医药分析多年来一直很重要, 并已成为新药开发和制剂研究的基础^[1]。然而最近生物医药分析作为医疗监护的一部分, 处于发展阶段, 就使得药物分析走到了应用分析化学的前沿^[2~6]。本章涵盖生物医药分析中准确测定生物材料如血液、尿液或组织液中已知药物或某一代谢物的浓度。这些技术在用于法医学和临床毒理学等新领域也显得至关重要^[7]。这种方法不可避免地与被考查药物的代谢和药理学知识联系起来^[8~13], 这是因为为了保证选择性和灵敏度, 代谢学的知识决定了所用的技术。反过来, 被考查药物的药代动力学性质决定了所需达到的检测限。

药物及其代谢物存在于复杂的生物基质中, 如血液、尿液、唾液、脑脊液 (CSF) 和固态组织。多数情况下, 待测浓度在微克到纳克甚至皮克水平。基质通常含有大量内源性物质。这些化合物对测定药理活性物质的物理或化学分析方法产生干扰。因此, 除非待测化合物有选择性超高的分析方法, 测定前将它从干扰物质中以物理手段分离出来通常都是必须的。因此, 多数药物分析必须包括一个分离步骤和一个检测步骤。分离步骤将药物从生物基质分离出来。分离可以采取柱分离、固相萃取、溶剂萃取或简单的色谱溶剂如乙腈去除蛋白法。近年来, 超临界流体萃取适用于低极性到中等极性的化合物。在任何特定情况下先决条件取决于基质、药物和代谢物的性质。药物浓度范围显然是很重要的, 它决定着分离和分析方法的选择。

药物及其代谢物萃取的化学基础

许多药物比基质亲脂性强, 为测定需要须将药物从中分离出来。这是 Brodie 原理的基础, 即用弱极性溶剂将药物充分萃取出来^[2]。相反, 多数代谢物比它的原型极性更强, 所以简易多溶剂萃取系统可以把药物和代谢物分离开。例如, 硝酸甘油可用庚烷、正己烷或戊烷萃取后定量测定。然而, 它的代谢物甘油二硝酸酯和甘油单硝酸酯不能用上述溶剂萃取。

有时药物和代谢物能提取进同一个溶剂。例如, 氯丙嗪、单去甲氯丙嗪、双去甲氯丙嗪和氯丙嗪硫酸酯能被庚烷提取^[11]。然而, 在 pH 4~11 间调节水性介质至不同值可将上述化合物逐个提取到庚烷中。氯丙嗪分析采用 pH 4.6 反萃取就是利用了这个原理, 大部分氯丙嗪留在庚烷相, 而所

有的代谢物进入水相, 为特异性分析提供了基础 (图 1)。

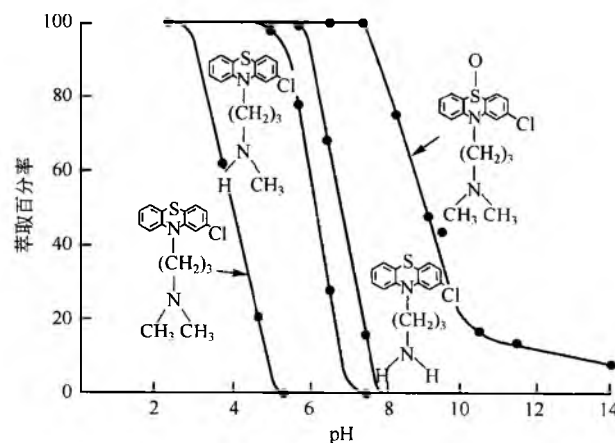


图 1 氯丙嗪及其三个代谢产物用含有 1.5% 异戊醇的庚烷提取的萃取率与 pH 的关系 (图中所示是当用等体积混合溶剂平衡时水相中残余的百分率^[11])

药物分析中一个重要发展是在磺胺二甲嘧啶测定中使用 Bratton-Marshall 技术。在 Bratton-Marshall 分析技术中药物被转化成偶氮染料。然而若要一并分析乙酰化产物, 需要将代谢物水解回磺胺二甲嘧啶并使用不同的计算方法。然而水解条件会造成一定量药物原型的降解, 这会引入分析误差^[12]。这些误差可以用液相色谱的方法克服。

虽然衍生是萃取的一条有效途径, 但是通常在分析过程中加入额外的步骤, 可能会带来干扰测定的副产物。衍生也可采用固相萃取, 其优点在于试剂、衍生物和副产物保留在固定相上。需要时, 在所需的衍生物生成后, 可将其他衍生物及副产物选择性地从柱上洗脱下来。此外, 这种方法避免了从生物基质中液-液萃取时乳化的问题。最后, 固相萃取容易与其他分析检测手段如气相和液相色谱实现自动化^[14]。固相萃取使用的固定相就是其他萃取方法中所用的标准固定相^[14]。

超临界流体萃取适用于低极性到中等极性的化合物。该项技术使用超临界和亚临界的 CO₂ 从基质中提取化合物。它的优点之一是减少了萃取过程中使用危险或昂贵的化学试剂。研究表明超临界萃取法有强大的功能, 可替代其他萃取方法^[15]。已有报道采用超临界流体技术将氟康唑、苯并二氮类药物、阿昔洛扑和吗啡从制剂或生物基质中分离出来。利用超临界萃取可减少样品处理, 避免降解因素如光、热或氧气及试样负荷量大 (可实现痕量分析)

的影响,并在萃取过程中更有效避免不需要的化学反应。虽然 CO_2 是超临界萃取中最常见的溶剂,但其非极性特征可能限制了它的应用。为了弥补这个不足,可加入极性有机溶剂提高萃取效率。使用超临界流体萃取方法时有几个因素必须考虑。虽然被分析物在超临界流体中的溶解度很重要,但并不总能保证可被提取。要考虑被分析物在基质中所处的位置,当被分析物与大的基质活性部位相互作用时,可瓦解提取。因此,可能需要更长的萃取时间、更高的萃取压力、更高的萃取温度和更强的改性剂浓度。回收率最好在真正样品中测定,而不是模拟的样品。

在最近 25 年间,气相色谱,更多的是液相色谱和液质联用色谱已成为选择性测定的选择方法。在非特异性的萃取后色谱柱进行特异性的分离,色谱检测器实现定量测定。药物色谱分析文献不胜枚举,分离数据似乎无穷无尽。许多涉及衍生的分离遵循了传统色谱原理。

在最近 10 年间,生物医药分析进展主要涉及气相或液相色谱,后者使用紫外-可见光吸收或发射、电化学氧化还原作为检测手段或免疫分析。液质联用技术选择性好、灵敏度高、准确而快速,一引入这个领域就迅速成为黄金标准方法。目前 90% 的生物医药分析采用该项技术。色谱分析和免疫分析技术各有优缺点。例如,色谱检测前分离耗时长,而免疫分析依赖具有高度特异性的抗体,这些哺乳动物源性抗体通常针对特定的分子,不需分离。

色谱

色谱的特点是流动相通过敞开床或柱状的固定相。进入色谱系统的混合物各个成分因为对流动相和固定相相对亲和力不同而分离。亲和力低的成分通过系统(柱或床面)的速率比和固定相亲和力高的组分大。迁移速率取决于溶质分子的结构、固定相和流动相组成以及环境因素,如温度。

色谱系统可以根据流动相是气体还是液体来分类,因此有了气相色谱(GC)和液相色谱(LC)之间的区分。固定相则可能是液体或固体。经常使用色谱系统包括的是气-液色谱(GLC)、液-液色谱(LLC)以及液-固色谱(LSC)。在纸色谱(PC)中,纸用作固定相(液体)的支持物。在薄层色谱(TLC)中,吸附层(如硅胶)涂布在一个合适的惰性板(如玻璃)上,吸附层可作为一个固定相或一种液体固定相的支持物。在柱层析色谱系统(CC)中,固定相包埋在玻璃或金属的封闭柱中,流动相从中流过。

色谱技术的巨大成功主要归功于色谱系统的超高分离能力和极高灵敏度的检测器的发展。

1. 气液色谱

GLC 是一种分离挥发性或化学衍生后具有挥发性的物质的方法。历史上,它是第一个用于生物基质中痕量分析的色谱方法。被分析样品通过瞬时气化,然后在惰性气体

的携带下,沿着装有液态固定相的柱子行进,液态固定相涂布于惰性载体上。由于样品中物质对流动相和固定相亲和能力不同而分离,一些组分先于其他组分从柱子上洗脱下来。各分析物从色谱柱中出来后进入检测器而被检测,后者相当于一个转换器。

只在很少情况下生物学样品能直接注入气相色谱仪。通常,样品必须经过预处理净化过程。净化过程可能简单,也可能要求严格,这取决于被分析的化合物。当体分析需要用多溶剂萃取,但是一些测定乙醇含量的方法允许将全血直接注入气相色谱仪。样品准备取决于未知化合物的数量、浓度、干扰物质和柱子使用的材料。

净化完成之后,一些样品在注入气相色谱仪之前可能需要进一步的操作。一些同族化合物由于结构近似以至于不能很好分离,除非把它们首先变为衍生物,如硅烷基醚。通过把化合物转变成醚类,分子变大并且更容易分开。

必须选用合适的样品溶剂进样。GC 最常用的溶剂是丙酮、乙醇、氯仿、正己烷和其他易挥发的有机溶剂。气相色谱分析中极少用水作为溶剂。

用微量注射器把样品(1~15 μL)通过橡胶隔膜的注射口注入气相色谱仪。注射口被一个金属块包围,金属块配有独立加热单元,可以把金属块加热到比柱子高得多的温度。金属块的温度取决于混合物里最难挥发化合物的沸点,通常比柱子的温度高为 50~100 $^{\circ}\text{C}$ 。气化的样品在惰性气体(如氩或氮)的携带下沿着色谱柱运动。样品主要物质的柱内移动速度取决于气流压力和柱温。柱温由一个独立于金属块加热单元的独立烘箱保持,该烘箱同时还加热检测器。

每个成分在指定的温度和压力下以不同的保留时间从柱子中流出。每种化合物的保留时间的特性成为气相色谱分离的基础。各种组分的分离取决于其在试样行进的气相和涂层固定相之间的分配系数。

柱子可以是金属的、玻璃的、空心的或有涂层的玻璃或者尼龙毛细管。金属和玻璃柱子可以是直的、线圈形或者 U 形,长为 1~6m,柱径大约 0.5cm。毛细管柱径非常小(0.1cm),长度大约 25m。通常,柱子越长,分离效果越高。

柱子填料主要由两种基本成分组成,惰性的担体相和液态固定相。担体通常是一种粒径均匀的惰性材料。虽然也使用 Celite、耐火砖和玻璃小珠,但是硅藻土则是经常使用的担体。粒子大小对分离和效率是非常关键的。但是,更小的粒子会增加较紧密的媒介的阻力,抑制气体的流动。

柱子的液相成分通常负责分离混合物的各种成分。考虑化合物的主要特性应该是极性和挥发性,而这层柱子液体涂层应该是不挥发的和耐热的。其沸点应该比分析物分析时的最适温度高 250~300 $^{\circ}\text{C}$,并且有低黏性。高黏性的液体会减少柱效。熔点应该保证这层涂层在最合适的分析温度下成为液体。

非极性的柱子涂层材料包括硅油、碳氢化合物和高相对分子质量醇酯,以及二元酸,而聚乙二醇、聚酯、醚、碳水化合物酯、乙二胺的衍生物广泛用于极性体涂层。

S

现在已经能够购买柱子添装材料。实际上,可以购买填好所需的载体和固定相的色谱柱装入色谱仪使用。

混合物里的每个组分都从柱子洗脱,通过各种检测器检测。检测器认出的信号在静电计里变为电能。这个小信号被放大并驱动记录仪的笔,在那里它被作为一个峰记录下来。

记录器跟踪两个不同种类的信息:①辨别一个化合物的保留时间(峰在这个样品注射之后出现所花费的时间);②通过未知峰下面积同已知浓度的相同分析物标准峰下的面积的比较来定量化合物。

检测器的功能是对被柱子分离的通过载气带到检测器的不同成分进行鉴别和定量。虽然有很多不同种类的检测器在 GC 里使用,但是只有少部分能在生物医学中应用。根据流出载气中的各种化合物的数量按比例而产生非常小的电流。然后静电计把这个小电流放大驱动记录仪的笔。因为生物分析中溶质的量非常小,在 10^{-10} mol 范围,所以使用的检测器必须极其灵敏和稳定。

热导检测器对所有类型的化合物都能响应,灵敏度约有 10^{-8} mol 样品。不过,它对温度变化和载气流速的改变非常敏感。在这个检测器里,一根很细的金属灯丝安置在柱子的末端,并且让电流通过将其加热。当流出的气体通过灯丝时,发生温度变化,改变其电阻。当载气包含样品的组分时,与载气单独通过时相比,引起更大的温度变化,并且使灯丝内的电阻产生更大的变化,同时引起通过灯丝的电流更大的变化。在实际操作中,使用两个检测器:一个作为参比池,仅仅只通过载气;另一个作为样品池,包含被蒸发的样品和载气通过。这两个检测器被安置在平衡电路中,通过调整各种各样的电阻器,使得当两个检测器只流过载气时不产生电流。当载气中的溶质通过一个检测器时,引起电阻改变从而影响了电流的变化。被放大的信号被作为一个峰记录在图谱里。

有机化合物在氢火焰中燃烧而电离。如果电位差为 150V 的两个电极被插入这火焰中,就可能测量从柱子中洗脱的溶质燃烧引起不同的火焰传导性的差别。这是火焰离子化检测器的基础。在通常的火焰检测器里,流出柱子的气体与氢气混合。这种混合物被送入检测器的火焰喷射口中。喷射口是一根薄壁的不锈钢管,它也作为一个电极。另一个电极是位于喷射口上方的铂丝。这个检测器的响应实际上是同时的。同热导检测器不同,它不大受温度和载气流速变化的影响。它也非常敏感并且能检测 $10^{-10} \sim 10^{-15}$ mol 样品。

在氦电离检测器内,氦作为载气。进入检测器时,氦原子被从放射性源来的 β 粒子电离。被电离的氦原子与有机的样品分子相撞,产生二级电子,产生一个与在载气中样品的浓度成正比的电流。电流被放大并记录。二级电子也产生更多的氦离子补充在与样品分子相撞而失活的那些离子。这类检测器不受温度和载气流速的影响。它的灵敏度大约与氢火焰离子化检测器相同,即 $10^{-10} \sim 10^{-15}$ mol 样品。

电子捕获检测器有一个低能量的电离放射源。撞上样品分子的电子有足够的能量进入分子的电子层并且被捕获,但没有更大的能量把分子撞成离子。原先电信号因电子捕获而降低。含有卤原子和一定极性官能团的化合物最容易通过电子捕获而检测。如果被分析的化合物不含卤原子,进行色谱仪之前必须卤化。这个检测器比氦电离检测器对温度波动更敏感,但是对载气流速方面的变化相对不敏感。这个检测器极其敏感,能检测 $10^{-15} \sim 10^{-20}$ mol 样品。

有时,当遇到极其复杂的生物样品时,单独 GC 不能满足所要求的足够的特异性或者灵敏度。此时,就要使用极限检测器,质谱 (MS)。在 GC-MS 里,来自气相色谱的洗脱气被直接送到质谱的真空室,在这里被分开的样品通过一束大约 70eV 的能量电子碰撞而被电离,或者通过与一种离子化的反应气体(化学电离)相撞而电离,反应气体也是通过电子碰撞而电离的。被电离的样品离子在一个强磁场或电场中加速,在顺着一弯曲的轨迹运行一段距离后,样品落在一个照相底板上或者被一个离子检测器收集。照相底板上的黑暗区域(分析离子碰撞区)的位置依赖于离子的质量对电荷的比率 (m/z),如果知道样品分子中原子的同位素自然丰度,可以用于对分析物作鉴别和定量。有时候,可用具有时间鉴别的离子检测器来区分各种质荷比成分到达检测器的时间(飞行时间质谱),因此可以鉴别多个成分。当今的 GC-MS 在药理研究实验室占有一个至关重要的位置,它使因量太小而不能被其他方法检测的代谢物的鉴别和结构的确定成为可能。

GC-MS 的应用可通过三氟拉嗪的数据(图 2)来说明^[11]。经治疗的患者血浆中含有三氟拉嗪。在该分析方法中,痕量的(少于总体 1%)放射性标记的三氟拉嗪被添加到样品中,此外加入氘代三氟拉嗪。氘代三氟拉嗪用作“冷携带体”(保证三氟拉嗪能够被适当地萃取)和质谱的内标。同位素标记的三氟拉嗪用于评价萃取回收率。质谱仪在一个或多个 m/z 值处监测“冷的”原先的三氟拉嗪和氘代三氟拉嗪(一般是 407 和 410,母离子 m/z)。通过标准的 MS 比来定量。

2. 高效液相色谱

虽然 GLC 在分析上取得了极大的成功,但是这种方法确实具有很大的局限性。尤其是它仅限于挥发性而且热稳定的化合物,因为多数药物及其代谢物都在中性 pH 时带电,很多药物是脂肪胺类。大分子,如多肽,在气相色谱仪进样口是不稳定的,并且也难以通过 GLC 分析。不过液液分配色谱不需要加热,所以更适合离子和大分子药物。此外 LLC 优于 GLC 在于移动和固定的液相的化学性质都影响分离亦即分析的选择性。在 GLC 里,只有固定相影响化合物的分离。在 LLC 中,可以用极性大小不同的液相作流动相,极性小的称为正相色谱,极性大的称为反相色谱。

LLC 早期在色谱分析上未能领先于 GLC,主要原因是 LLC 在液相中物质传递更耗时间。溶质在流动相和固定相间转移主要为扩散,液体比气体黏度大,液体中物质传输

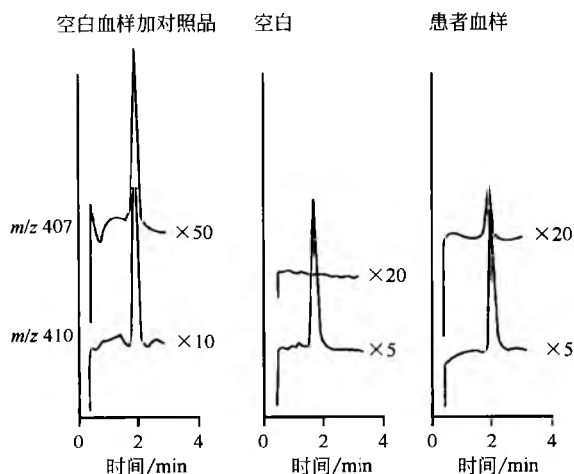


图2 三氟拉嗪的 GC-MS 分析。在 407 和 410 (m/z) 不同质荷比时, 空白血浆、三氟拉嗪加入到空白血浆中以及已治疗患者的血浆, 各种背景衰减 ($\times 5$ 、 $\times 10$ 、 $\times 20$ 和 $\times 50$) 的变化轨迹。这种方法检测“内生”的三氟拉嗪 (m/z 407) 和氘代三氟拉嗪内标 (引自: *Journal of Pharmacy and Pharmacology*)

速率比气体中慢 10^5 倍; 即在 LLC 柱内建立分配平衡非常慢。此外, 由于分离效率随着色谱柱的长度增加而增加, 而液体黏度高, 相对气体径向移动较慢, 所以通过增加柱长来提高分离效率会增加分析时间。

提高溶质扩散速率的唯一途径就是充分提高温度, 但这将给分析不稳定化合物带来麻烦。另外的办法是缩短扩散距离。有效分离因此需要使用更小的柱填充粒子。这个看似简单的权宜之计孵育了 LC 成为在速度和复杂混合物分离效率上可与 GLC 相媲美的技术, 而且较 GLC 可应用于更多种物质^[16-19]。目前可用的填充材料粒径为 $5\mu\text{m}$ 。粒径更小的填料极难处理, 液相几乎难以通过。为了解决这个问题, 把直径 $30 \sim 50\mu\text{m}$ 的实心玻璃珠涂上一层多孔材料, 称为薄膜小珠。多孔的层可作为固定, 或覆盖一层极薄的液体作为固定相, 具有相当大的表面积。

这层薄的固定相, 如果未加处理, 可能会在高压下被流动相冲走。一种解决办法是把液体层化学键合在固体担体上。多孔硅珠被各种醇酯化, 构成相应的硅酸酯。这些酯化的硅胶材料热不稳定, 易于水解并且易与低级醇交换。另一种化学交联材料是硅酮聚合物, 因其三维交联结构, 所以更加稳定。对荷电分析物, 常用离子交换树脂或者纤维素作为填柱材料。

充满微小粒子的柱子需要高入口压力, 以产生合理的流动速度。直径小的色谱柱 ($2 \sim 3\text{mm}$) 通常使用的压力是 $30 \sim 300\text{atm}$ ($1\text{atm} = 1.01325 \times 10^5\text{Pa}$, 下同), 流速 $0.5 \sim 3\text{mL/min}$ 。

HPLC 仪由流动相容器、进样系统、色谱柱、检测器和记录仪组成。这些组成部分大多数的操作是明显的, HPLC 仪系统图解见图 3。

更小的色谱柱和更高流速对检测系统提出了非常高的要求。流通检测器必须死体积小, 而且灵敏度高。检测器

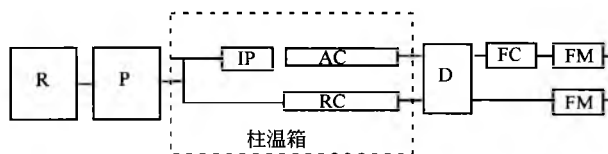


图3 高效液相色谱系统框图。R. 流动相容器; P. 泵; IP. 进样阀; AC. 分析柱; RC. 参比柱; D. 检测器; FC. 组分收集器 (制备用); FM. 流动相流速计

死体积应该不超过分析物峰体积的 $1/10$ 。因为高效 LC 色谱柱峰体积约为 $50\mu\text{L}$, 大约要求 $5\mu\text{L}$ 的检测体积。

生物痕量分析目前有 3 种主流检测器: 吸收光度检测器、荧光检测器和电化学检测器。虽然还有其他检测器, 但只有以上三种能检测 $10^{-9} \sim 10^{-12}\text{g}$ 的分析物, 这种检测能力在生物医药分析中尤其是涉及小量药剂时特别需要。

使用最广泛的检测器是吸收光度检测器, 它是以紫外吸光为基础的。虽然它们在实际应用时不通用^[19], 但是许多物质的确吸收紫外光, 包括具有 π 键电子和未共享 (未成键) 电子的化合物, 如烯、芳香烃及包含 $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{C}-\text{S}$ 、 $\text{N}=\text{O}$ 和 $\text{N}=\text{N}$ 的化合物。紫外检测器吸光度 A 与样品浓度成正比并且服从比尔定律: $A = \mu c l$, μ 是摩尔吸光度, l 是检测池长度; c 是样品浓度。紫外检测器基本不破坏样品。样品在检测器流通池停留时间短, 几秒钟或更少, 使对紫外线对光敏化合物的降解减到了最小。两种类型分光光度检测池广泛用于商用 HPLC 系统^[16]。在 Z 形 (图 4) 流通池, 流动相中途进入一个窗口, 与光线共同穿过两窗口之间的距离, 从另一端的窗口流出。分流或 H 形检测池 (图 5) 能使流动相波动引起的噪音和漂移减到最小。流动相流入光路的中心, 分流并往相反的方向流去。在光路的两端, 流动相经过检测池窗口并且在下一级管路中合并在一起。这个检测池光路的尺寸直径大约是 1mm , 长 10mm , 内部体积大约 $10\mu\text{L}$ 。

HPLC 中使用两种类型的光度计: 固定波长滤过光度计和可变波长分光光度计。它们以低压汞弧灯为光源, 以透射或干涉滤光器分离一小段波长的光, 这部分光激发样品, 再以光电二极管检测通过样品的光强度。

大多数商用的固定波长紫外检测器是利用低压汞弧灯的 254nm 的强光源。高强度的辐射提供了极好的检测能力来检测小孔的微量体积的流通池。大多数辐射集中在一个狭窄波长的频带里, 对滤光片要求不高, 以提高检测器的线性范围。

254nm 波长有广泛应用。生物学中重要的化合物如芳香氨基酸、蛋白质、酶和核酸在 254nm 强烈吸收。由于 254nm 检测器固有的高灵敏性和紫外线吸收带非常宽, 它适用于许多最大吸收不在 254nm 的化合物。而如今 254nm 、 280nm 或两者同时检测的仪器都有, 均可检测 254nm 吸收。 280nm 检测器使用含磷的屏幕把 254nm 光转变为 280nm , 由于磷发射带宽较大, 因此需要牺牲一点线性动态范围。

近年来, 输液泵和色谱柱技术的发展大大扩展了 HPLC 的应用范围。因为色谱工作者把 HPLC 用于越来越

S

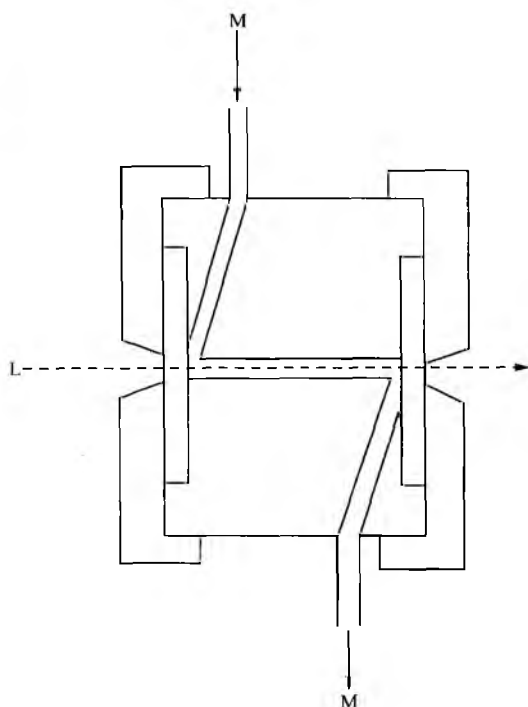


图4 Z形检测池结构示意图。M. 流动相路径；
L. 通过石英窗和流动相中样品的光路

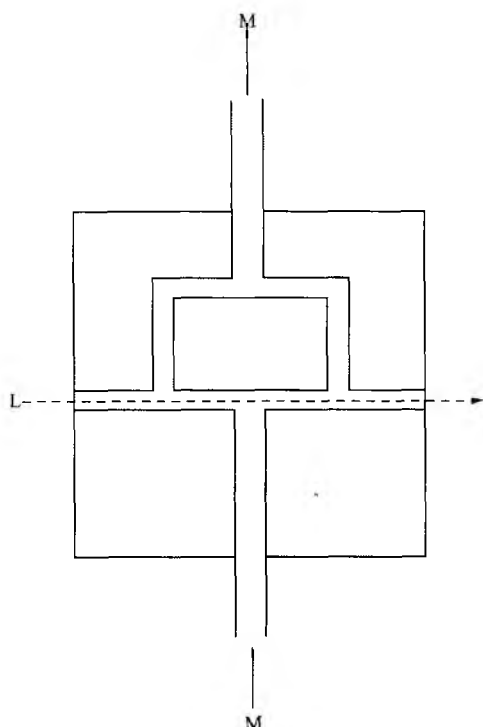


图5 H形检测池的结构示意图。M. 流动相路径；L. 光路

复杂的分离，这就需要一个可选择紫外波长的吸光度检测器来优化样品响应，去除干扰的同时还能进行小于 254nm 的检测以能分析碳水化合物和脂肪酸那样的化合物。这种

需要推动了更复杂可变波长紫外检测器的发展。这些检测器使用连续光源，如氙灯（输出 190~400nm）和单色器以分离所需的窄带波长。通常，单色器能分离刻度波长为中心带宽为 2~16nm 的光。氙灯-单色器-光电倍增管（或者二极管阵列）系统比固定波长检测器汞灯-滤光器光电二极管系统昂贵。

溶质分子吸收紫外线或可见光激发后发射荧光是荧光检测器^[20]的基础。

荧光计是一种灵敏度高和选择性好的检测器，适用于许多化合物包括某些代谢物、氨基酸、维生素和受紫外线激发的许多药物。此外，很多本身无荧光的物质的可制成荧光衍生物，如类固醇^[19]。HPLC 荧光检测器类似于常规的荧光计。虽然可变波长狭缝荧光计已经开发，专门用于 HPLC，但是大多数荧光检测器仍然使用滤光器。滤光器允许通过的光带宽通常比单色器宽，这常常成为这种检测器的一个优点，因为检测器不需针对每种流出化合物进行调节。而且，滤光检测器远比可变波长光栅检测器便宜。

在激发波长和浓度范围内，简单荧光吸收与浓度呈线性关系。荧光检测器易受常见的荧光测量干扰，主要是背景荧光和荧光猝灭。

荧光计工作时，紫外线光源发出的光滤过并聚焦在检测池上。样品向四面八方发射荧光，因此可以在光路方向（极少使用）或与光路垂直的角度测量荧光（图 6）。激发光被滤光器阻滞，然后用光电池测量发射光的能量强度。几乎所有用于紫外检测器不含卤原子的烃都能作为荧光检测器溶剂。卤代烃类溶剂，如 CH_2Cl_2 或者 CHCl_3 ，应该小心使用，因为它们倾向于“猝灭”或者减少荧光。溶剂对荧光的强度有很大影响，如喹啉是在正己烷里无荧光但是在酒精中有荧光。

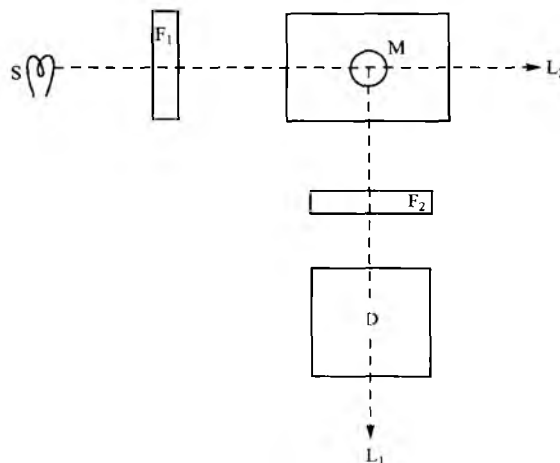


图6 荧光检测器框图。S. 激发光源； F_1 和 F_2 . 激发光和发射光的滤光片；M. 含有流动相的检测池，激发光和发射光均能透过，流动相的路径垂直于纸平面；D. 检测器， L_1 和 L_2 . 用直角和几何轴线检测的荧光光路。当采用轴线排列时， F_2 和 D 应与 S、 F_1 和 L_2 同轴线



人们设计了能同时测量荧光强度和吸收强度的流通池,同时测量荧光和吸收信号能极大改进定量测定。协同测定扩展了荧光样品的测定线性范围。高浓度样品激发波长吸光度大于 0.01 时,荧光响应不成线性。然而高浓度时样品吸光强度常可测量而且与浓度呈线性关系。荧光通常能检测比吸光检测低 10^{-6} 的浓度。荧光生来与紫外或可见光相比不那么普遍。如此说来与吸光度法相比,荧光计选择性更好但适用性不广,当然这取决于一些人的观点。

电化学检测的基础是已分离的分析物在微电极或薄片电极上的电量法氧化或还原反应。许多药理活性物质如醛、酮或醌(如多柔比星),或硝基化合物(如硝基咪唑),它们可以在汞或铂金电极上发生还原反应;富电子的吡啶衍生物和儿茶酚胺可发生氧化反应。电化学检测流动相必须能导电,这是一个重要条件。这一点使得电化学检测在反相色谱中尤其有用,因为其流动相通常为加入一种或多种有机助溶剂的缓冲液。

电化学检测的选择性取决于分析物氧化还原半波电位的差异。甚至半波电位完全相同的分析物,通过在流动相中加入络合剂或改变流动相组成可把它们区分开。为了进行电化学定量,工作电极和参比电极电势差保持在分析物氧化还原平台值。记录的扩散电流由被测物氧化或还原反应产生,与被测物洗脱峰面积成比例。为了测定分析物的绝对量,需要同时测定标准品的扩散电流,通过比较得出未知样品中分析物的量。

电化学检测器流通池直接连接 HPLC 柱后洗脱液的仪器有几家生产商生产。当安培电路采用直流脉冲极谱进行时,检测灵敏度可与吸收分光法相当。

3. 液质联用技术

由于具有高选择性、高灵敏度和越来越容易以合理的价格获得桌上型仪器,液质联用(LC-MS)技术正迅速成为一种非常普通的分析方法。从 20 世纪 70 年代起,出现了许多去除流动相以使被分析物电离的方法,包括快原子轰击、粒子束电离、热喷雾电离、电喷雾电离和大气压化学电离。近年来,最普遍的技术是应用电喷雾电离和大气压化学电离技术的 LC-MS。电喷雾的优势是它能测定大分子化合物(如多肽)和强极性化合物(如季铵、磷脂等),其中关键是这些化合物必须在溶液中电离。因此经常需要向流动相中加入少量挥发性酸或碱,增加这种易挥发酸进行电喷雾检测是必要的。与此相比,大气压电离技术更适于相对分子质量小和中等极性化合物的分析。

免疫分析

免疫分析法在生物医药分析领域正日益变得重要起来^[21, 22]。免疫分析法能分析其他技术手段所不能做到的生物基质中纳摩尔[尔]或皮摩尔[尔]水平的大分子聚合物,为生物化学家提供了基本的信息。此外,随着免疫分析在药物、农药、激素和蛋白分析中变得非常重要,诊断方法学取

得了长足的进步。免疫分析法花费低廉,适合自动化,加上其灵敏度和特异性,使其可以在诊断中与色谱方法相媲美。

免疫分析法主要基础是,标记的与未标记的配体竞争性结合抗体上特异性受体位点。竞争性结合通过测定标记的相关物理或化学性质来分析,可以由此建立标准曲线。曲线代表测得的随着结合标记物改变的物理信号与未标记物浓度之间的函数关系,由此曲线可以计算出未知分析物的浓度。

从全部标记分析物的信号响应分离结合的或未结合的相应信号两种方法实现。第一种途径需要物理分离蛋白质(抗体)结合部分的标记分析物和游离部分的标记分析物。可以采用盐析法,即加入盐(如硫酸铵)或聚合物(如聚乙二醇)沉淀多余的与分析物结合的抗体,然后离心分离。也可采用固相萃取,即药物或抗体吸附在固相表面(微粒、管壁、浸渍片等),反应物之间在液相和固相中竞争,然后实现物理分离。这种称为非均相免疫分析运用在放射免疫分析中,放射免疫分析使用的标记具有放射性,通常为¹²⁵I 或³H,原位无法区分游离药物或抗体结合药物的放射活性。大多数免疫分析法以酶为标记,如酶联免疫吸收分析(ELISA),也属于非均相的。均相分析为第二条途径,不需要物理分离结合标记配基和游离的标记配基。溶液中结合标记配基的信号不同于游离标记配基的信号。当标记物为酶时产生信号的物质可能来自酶,结合配基后底物转化速率降低,或标记物是能产生荧光的基团。在这种情形下,环境影响作用于特定的标记物可导致信号改变。

不需分离的均相免疫方案比较非均相免疫分析而言有几条优点。由于不需要分离,减少了分析步骤,相应地也减少了分析时间。此外,因为减少了物理转移的步骤,潜在相对应的样品损失也避免了。低分子质量药物普遍采用不需分离的均相免疫分析(安非他明、地高辛)^[23]。

生物医药领域当前普遍应用的免疫分析为放射免疫分析、酶免疫分析或发光免疫分析(包括荧光免疫分析[FIA]和化学发光免疫分析)。虽然放射免疫分析是其中灵敏度最高的(通常可达 $10^{-12} \sim 10^{-15}$ mol/L),但是由于操作放射性物质的固有难题如许可制度、放射危害、放射性同位素保存时间短而且昂贵、计数器的花费和繁琐的非均相免疫分析,放射性免疫分析在使用普遍性上不及非同位素分析方法。

在均相酶免疫分析法中(EMIT),抗原或抗体用酶标记(如溶菌酶、碱性磷酸酯酶、horseradish 过氧化氢酶或 6-磷酸葡萄糖脱氢酶),而不是用放射性同位素标记。例如,碱性磷酸酯酶标记的药物可与未标记的药物竞争与药物相关的抗体结合位点。酶标记的药物与抗体结合后,酶失去活性(结合抗体的能力,酶失去活性如水解磷酸酯的能力)。然而游离的酶标记药物保持了酶的活性。如果向含有酶标记药物、抗体和未标记药物的溶液中,加入光学性质随磷酸酯化状态改变的可以吸光或产生荧光的有机磷酸酯,那么只有未与抗体结合的游离标记药物能产生与水解磷酸酯相应的荧光吸收光谱。因而,测得的吸收度或荧光强度,即水解的磷酸酯的量取决于加入的未标记的药物浓度,因为它决定了最终

S

有多少酶活力释放到了溶液中。使用基于吸光度法（比色法）的商业 EMIT 试剂盒，通过分析酶氧化的 NADH 来定量测定一系列药物的做法已经流行数年了。其灵敏度不是很高，检测药物浓度可达 $0.5\mu\text{mol/L}$ 。测量酶底物发射的荧光或化学发光可将检测限提高至 $10^{-9}\sim 10^{-12}\text{mol/L}$ 。

FIA 需要测量发光标记（荧光发射团）发射的荧光，荧光标记在一定程度上参与竞争免疫化学结合系统，而且其光谱性质在均相体系中随分析物浓度而改变。荧光标记物可用于均相或非均相免疫分析；它们可以结合抗原、抗体或固定相，或作为酶底物游离在溶液中。均相免疫分析法应用的荧光标记必须满足一些要求。因为荧光信号必须在血清基质中测量，所以荧光探针应该有高的发光效率，而且荧光激发和发射波长的极大值应当高于血清相应值。稀血清的激发和发射波长分别为 280nm 和 340nm。血清中应用的荧光标记物发射波长应该比血清相应波长长至少 50nm，或至少 400nm。

目前 FIA 最常用的荧光标记来源于发射光在长波长、发光强烈的氧杂蒽染料荧光素异硫氰酸盐（FITC）和罗丹明 B（RB200）^[23]。这些荧光发射团的异硫氰酸或异氰酸基团可以通过简单的方法标记溶液中的脂肪伯胺和仲胺。如此，它们可用来标记抗生素或烷胺基取代的药物分子。甚至不含烷胺基基团的药物也可以通过引入桥基（如胺乙基），来与异硫氰酸或异氰酸基团偶合。

非均相 FIA 可借助用于放射免疫分析的同样分离手段。多少有些权宜之计的均相 FIA 法通常需要荧光猝灭、增强或标记药物与抗体结合后发生标记荧光的位移。有时，与抗药抗体相关的第二抗体在双抗体法中用来沉淀结合的标记或未标记药物，或改变标记的光学性质，使分析更加灵敏^[24,25]。

即使当结合在抗体上的荧光标记物发光强度或光谱位置无明显变化时，均相 FIA 常受影响。如果使用高分子膜偏振光片偏振激发光和分析在偏振光激发下样品的荧光，通常会发现当存在大量抗体结合时到达检测器的荧光量大大减少，其他情况下不变。这是黏附于缓慢自转的抗体的标记物发射更多偏振光的结果。偏振发射光被分析器偏振片削弱的程度比非偏振光被没有结合大分子的快速旋转的标记药物削弱的程度大。这种现象构成了荧光偏振免疫分析的基础。未标记药物浓度增加减少了标记药物的结合，必然导致检测的荧光减弱，这可以用来建立标准曲线，未知药物浓度可以通过测量偏振荧光强度来测定。荧光偏振分析可能占当前 FIA 的大部分。

化学发光免疫分析^[25,26] 技术因为其与放射免疫分析相当的灵敏度而迅速推广开来，是 FIA 的一个变种。关于化学发光的著作最早发表于 20 世纪 30 年代，但直到 80 年代才试用于免疫分析。随着自动免疫分析器应用增加，化学发光法已成为临床免疫检测最常见的分析方法之一^[27]。化学方法发射的光（萤火虫、某些鞭毛虫、腔肠动物和霉菌发的光也称生物体所发之光）本质是荧光。然而，人们通常认为荧光由分子受吸收光激发出的发射光，这可定义为光致荧光或光致发光。高度张紧、还原性的分子氧

化时发生化学发光（如过氧草酸酯和氨基取代的邻苯二甲酸环胍）。后者氧化的最初产物反应时含有大量热能，因而自发地（不受光激发）成为电子激发，然后发射荧光作为回到最低能态的方式之一。氧化反应通常受金属离子催化，而且只有在化学发光前体（标记物）在溶液中自由扩散时反应才能检测到（如当前体物结合在抗体上或在酶反应中结合就不能快速产生荧光）。照此看来，它们是荧光标记物的类似物。然而，光致荧光分析检测了一部分分子即时吸收光子后发射的光。化学发光可以收集整合整个化学发光反应过程输出的光。所以，如果化学发光反应发光效率相当好（0.1），化学发光检测即可获得相当低的检测限。不幸的是，只有极少化学发光反应有高发光效率，所以与 FIA 相比可选择的标记物很受限。较老的化学发光体（发光氨、异发光氨和碱性酶）不溶于水性缓冲液，这使标记过程复杂化。然而，新吡啶酯链接硫酸丙烷取代基具有好的水溶性，增强了灵敏度和整个分析过程的粗放性^[27]。化学发光免疫分析是一个正处在上升阶段的领域，可能促进新标志物的发现。

毛细管电泳

毛细管电泳是一项令人激动的高分辨率新分离技术，它应用于体液中药物及其药物代谢物的测定。第一台商业毛细管电泳仪于 1988 年面市，如今大约有 12 家电动毛细管仪器制造商，它们多数产品已完全自动化，包括自动进样和计算机数据处理^[28]。毛细管电泳根据物质在电场下不同的迁移速率，把溶液中的微量物质分离。分子在溶液中的迁移速率与其电荷成正比，因此正荷电量最高的分子最先被检测^[23,29]。毛细管电泳可以同时分离并定量测定阳离子、阴离子和不荷电的分子，而上样量仅 1nL，比 HPLC 样品量小 1000 倍^[28,30]。毛细管通常为细长口径的熔融石英管，内部充满电解液，直径 25~75 μm ，长 100cm，检测窗距离上样口约 50cm。进样方式分为流体静力学进样和电动力学进样，电渗流推动样品进入毛细管。缓冲液的作用是保持电泳液恒定的 pH，也可用来调节分离参数。充满缓冲液毛细管两端浸没在充满相同溶液的小槽中，小槽安放驱动电极（图 7）。施加电场后（电泳）样品实现分离。迁移速率取决于缓冲液 pH 和施加的电压。毛细管电泳采用高压（5~30kV）直流电来驱动电泳传输，实现样品分离。电泳和电渗共同作用推动样品在毛细管内运动，通过系统检测器^[23,28-31]。毛细管电泳已经使用的检测器包括各种 UV 吸收检测器、荧光检测器和质谱检测器。由于 UV 吸收检测器需要样品中药物浓度较高，所以不能达到生物体液样品定量检测所需的灵敏度^[28,30]。Hempel 报道了两种解决上述问题的方法^[30]。其一，采用囊泡检测池延长 UV 检测窗光路，但只能略微增加灵敏度；其二，采用 Z 形毛细管流通池。流通池由弯毛细管组成（图 8），类似于色谱中的 Z 形检测池（图 4）。Z 形毛细管流通池允许数毫米毛细管与光源平行。这种设计似乎解决了以往检测器光散射的问题。通

常毛细管电泳检测池光路比 HPLC 的短 100 倍^[30]。

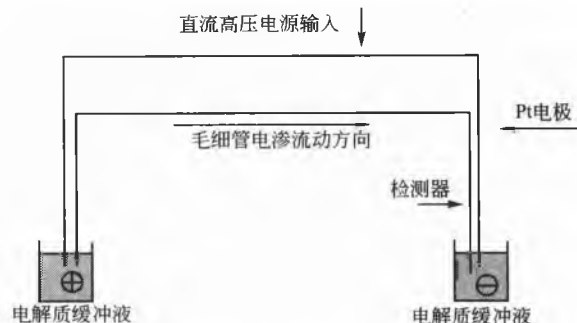


图7 毛细管电泳系统的结构示意图

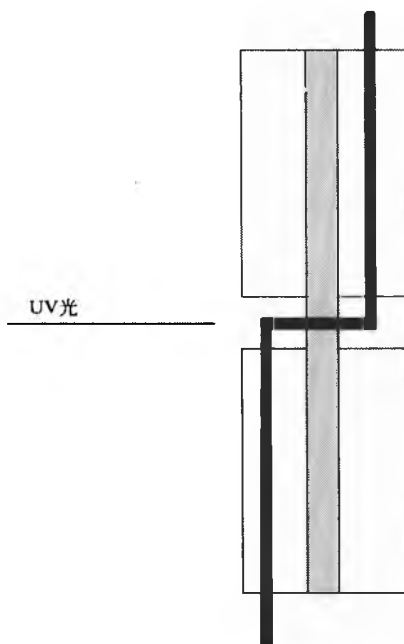


图8 Z形毛细管流通池的结构示意图

数种电泳分离技术已用于分离一系列大小分子上。其中用途最大的是胶束电动毛细管电泳 (MECC) 和区带毛细管电泳 (CZE)^[28, 31]。MECC 是电动毛细管色谱技术，它在缓冲液中加入了表面活性剂 (如十二烷基硫酸钠)，在足够的浓度下表面活性剂形成胶束。此项技术取决于形成胶束，胶束在电场作用下向某个电极迁移。分离过程中存在清晰的两相，水相和半固定相。毛细管中荷电胶束和整个液体同时迁移形成电渗。两相迁移速率不一致，为样品作色谱分离^[28]。电渗流和毛细管壁化学性质是分离的重要因素^[32]。MECC 适用于荷电和不荷电的药物，它们根据在胶束和周围缓冲液中的分配不同而分离。此外，它能直接分析血清或其他含蛋白质的液体^[28, 31]。CZE 是一项非色谱分离技术，虽然它不能分离中性物质，但它可能是如今最简单、使用最广泛的电泳分离技术^[23, 28]。CZE 分离建立在分析物不同荷质比的基础上，荷电最高的分析物首先被检测。CZE 分离效率通常为 HPLC 的 10~100 倍，检测灵敏度达 10^{-18} mol，甚至更低^[23]。

激光诱导荧光 (LIF) 检测可用来分析产生荧光的物质，如氟奎诺酮类抗生素在激发波长 325nm 下产生天然荧光。然而，目前为止，LIF 因为可获得的激光波长范围有限，应用还很少。该检测方法对日常试验仍是非常昂贵的，这很不幸，因为它把检测限推到了 10^{-21} mol 水平^[23, 30]。毛细管电泳仍是一项新兴的技术，极有可能应用于生物体液中药物检测。

药物分析方法的评价

评价的判据包括：①空白的信号；②选择性；③精密度和准确度；④灵敏度；⑤花费。定量测定是药物分析的主要问题^[10]。人们认为粗略的准确度比错误的精密度高。药物分析在统计上几乎没有独特之处，所以本文没有必要考虑统计上的问题如变异系数。一般说来，药物分析家更喜欢两个值的平均而不是单个值。一式三份不会再有更大的价值。生物学研究普遍使用单个值；这是显而易见的，可获得的生物样品往往只能进行一次分析。所有报告必须包含研究者手中方法学精密度和准确度的数据，甚至包括公开报道、确证有效并且可以使用的方法。

药物定量分析的几个特殊方面与信号空白比，尤其是药物动力学实验有关。首先，空白血浆 (为未给药患者的) 含有产生我们所分析药物阳性信号的物质。这些信号显然必须减少到最小 (降低“空白”)。所关注的信号通常应该比空白信号高许多。可是，最有价值的科学结论经常取决于接近于空白的信号。过去，小于空白 3 倍的信号不使用。实际上，这个经验法则是过分简单化。只要它们科学上或统计上比空白信号大，比空白 3 倍小得多的信号就是可用的。是否使用取决于空白的精密度和最低检测点，只有通盘考虑分析方法的重现性才能合理确定。顺便指出，和其他分析工作一样，高于空白信号而低于最低定量点信号的信号不能作为做出结论的根据。

药物分析者一定要小心鉴定和处理样品。如血浆、血清和全血药物浓度可能不同。这三种介质的萃取特性也不相同。这意味着需要标准化和数据报告。建立标准的绝对规则是类似比较。当然在试验样品时，建立杂质和代谢物的混合与测试样品完全相同的标样是不可能的，但必须保证使用相同生物基质。此外涉及收集和储存、不同实验室之间的转运等，标样应该同样品的操作条件相同。一些药物分析者已经建立了质量控制方案来测试方法的重现性。如在临床实验室中使用的质控图表其作用是显而易见的。多中心质控方案已经产生了一些预警作用和提示可能有错误的结果。多种非特异因素可能会对药物的分析产生负面影响。例如，样品处理中出现溶血、采血管细菌污染导致药物酶解损失、抗凝剂的干扰、离心条件、注射器和试管进入样品的污染物，以及使用抗氧化剂引起药物代谢物向原药的转化。只有应用相似比较的原则才能解决这些问题。

参考文献

1. Brodie, B. B. Physicochemical and Biochemical Aspects of

- Pharmacology. JAMA 1967, 202 (7), 600—609.
2. Brodie, B. B.; Udenfriend, S.; Bear, J. E. The Estimation of Basic Organic Compounds in Biological Material. J. Biol. Chem. 1947, 168, 299—309.
3. Rowland, N.; Tozer, T. N. Clinical Pharmacokinetics; Lea & Febiger, Philadelphia, 1980.
4. Evans, W. E., Shentag, J. J., Jusko, W. J., Eds. Applied Pharmacokinetics, Applied Therapeutics; San Francisco, 1980.
5. Benet, L. Z.; Massoud, N.; Gambertoglio, J. E. Pharmacokinetic Basis for Drug Treatment; Raven Press; New York, 1983.
6. Fedeniuk, R. W.; Shand, P. J. Theory and Methodology of Antibiotic Extraction from Biomatrices. J. Chromat. A. 1998, 812, 3—15.
7. Maurer, H. H. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Forensic and Clinical Toxicology. J. Chromat. B 1998, 713, 3—25.
8. Smith, R. V. Determination of Drugs and Metabolites in Biological Fluids. Trac-Trend Anal. Chem. 1984, 3 (7), 178—181.
9. Curry, S. H. Drug Assay in Therapeutic Monitoring. TracTrend Anal. Chem. 1986, 5 (4), 102—105.
10. Curry, S. H.; Whelpton, R. I. Statistics of Drug Analysis and the Role of Internal Standards. Blood Drugs and Other Analytical Challenges; Reid, E., Ed.; 1978; 29—41.
11. Curry, S. H. Determination of Nanogram Quantities of Chlorpromazine and Some of Its Metabolites in Plasma Using Gas-Liquid Chromatography With An Electron Capture Detector. Anal. Chem. 1968, 40, 1251—1255.
12. Whelpton, R.; Watkins, G. M.; Curry, S. H. Bratton-Marshall and Liquid-Chromatographic Methods Compared for Determination of Sulfamethazine Acetylators Status. Clin. Chem. 1981, 11, 1911—1914.
13. Whelpton, R.; Curry, S. H.; Watkins, G. M. Analysis of Plasma Trifluoperazine by Gas Chromatography and Selected Ion Monitoring. J. Chromatogr. 1982, 228, 321—326.
14. Rosenfeld, J. M. Solid-Phase Analytical Derivatization: Enhancement of Sensitivity and Selectivity of Analysis. J. Chromat. 1999, 843, 19—27.
15. Dean, J. R.; Khunder, S.; Extraction of Pharmaceuticals Using Pressurized Carbon Dioxide. J. Pharm. Biomed. Anal. 1997, 15, 875—886.
16. Byrne, S. H., Jr. Modern Practice of Liquid Chromatography; Kirkland, J. J., Ed.; Wiley-Interscience; New York, 1971; 195.
17. Synder, L. R.; Kirkland, J. J. Introduction to Modern Liquid Chromatography; Wiley-Interscience; New York, 1974; 144.
18. Hamilton, R. J.; Sewell, P. A. Introduction to HPLC; Chapman and Hall; London, 1977; 55.
19. Seiler, N.; Demisch, L. Handbook of Derivatives for Chromatography; Heyden; London, 1978; 346.
20. Hulshoff, A.; Lingeman, H.; Fluorescence Detection in Chromatography. Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Application; Part I, Schulman, S. G., Ed.; New York, 1985; Chap. 7.
21. Theorell, J. I.; Larson, S. M. Radioimmunoassay and Related Techniques; Mosby, C. V., Ed.; St. Louis, 1978.
22. Odell, W. D.; Daughaday, W. H. Principles of Competitive Protein Binding Assays; Lippincott; Philadelphia, 1971.
23. Christian, G. D. Clinical Chemistry. Analytical Chemistry; John Wiley and Sons Inc.; New York, 1994; 611—628.
24. Ullman, E. E., Langen, J., Clapp, J. J., Eds.; Liquid Assay: Analysis of International Development on Isotopic and Non-Isotopic Immunoassay; Masson; New York, 1981; 113.
25. Sharma, A.; Schulman, S. G. Fluorescence Analytical Methods and Their Applications. Introduction to Fluorescence Spectroscopy; Wiley-Interscience; New York, 1999; 123—158.
26. Karnes, H. T.; O'Neal, J. S.; Schulman, S. G. Luminescence Immunoassay. Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications; Part 1, Schulman, S. G., Ed.; Wiley-Interscience; New York, 1985; Chap. 8.
27. Messeri, G. Chemiluminescence in Immunoassays. Amer. Clin. Lab. 1998, 17 (1), 6—7.
28. Thormann, W.; Zhang, C.; Schmutz, A. Capillary Electrophoresis for Drug Analysis in Body Fluids. Ther. Drug Monit. 1996, 18, 506—520.
29. Brewer, J. M. Electrophoresis. Clinical Chemistry; Kaplan, L. A., Pesce, A. J., Eds.; Mosby; St. Louis, 1996; 199—212.
30. Hempel, G. Strategies to Improve the Sensitivity in Capillary Electrophoresis for the Analysis of Drugs in Biological Fluids. Electrophoresis 2000, 21, 691—698.
31. Perrett, D.; Ross, G. Capillary Electrophoresis of Drugs in Biological Fluids. Bioanalytical Approaches for Drugs, Including Anti-Asthmatics and Metabolites; Reid, E., Wilson, D., Eds.; The Royal Society of Chemistry; Letchworth, 1992; 22 (A), 269—278.
32. Baryl, N. E.; Lucy, C. A. Simultaneous Separation of Cationic and Anionic Proteins Using Zwitterionic Surfactants in Capillary Electrophoresis. Anal. Chem. 2000, 72 (10), 2280—2289.



生物药剂学

Leon Shargel
Eon Labs Manufacturing, Inc., Laurelton, New York, U. S. A.
Andrew B. C. Yu,
U. S. Food and Drug Administration, Rockville, Maryland, U. S. A.

引言

生物药剂学是在药物生物疗效基础上对药物（活性药效成分 API）的物理化学性质和制剂（即剂型）内在关系的研究（图 1）。

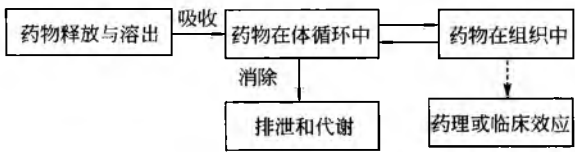


图 1 原料药、制剂和药理效应间动力学关系示意图^[1]

生物药剂学也研究各种生产工艺和技术对药品疗效的影响。生物药剂学利用定量手段和理论模型评价药物、剂型和给药途径在生理学环境下对药物和药品治疗作用的影响^[1]。

生物利用度通常用来评价药物的生物学表现，它被定义为活性成分或有效组分进入治疗部位的速度和程度（量）的指标。生物利用度也是治疗活性成分吸收进入体循环的速度和程度的评价指标。

生物药剂学指导制剂合理设计，使之以特定的速率将药物传输到体内，达到优化治疗作用和降低副作用的目的。如表 1 所示，生物药剂学是以药物理化性质、将来的制剂和人体解剖及生理因素为基础的。制剂的合理设计自然就包含了药效动力学和药代动力学的知识，前者包括制剂期望的起效时间、作用时间和临床效果；后者指药物吸收、体内分布、消除和有效浓度。

因此生物药剂学涉及了影响如下指标的因素：①制剂中药物的稳定性；②药物从剂型中释放的速率；③药物在吸收部位的溶解速率；④药物在作用部位的可获得性（图 1）。

药品设计中需要考虑的生物药剂学因素

药物通常是以药品（剂型）的形式给患者服用，药品包括有效成分和所选择的制成制剂的辅料组分。常见药物剂型包括溶液剂、片剂、胶囊剂、注射剂、栓剂、透皮制剂和局部用制剂。药品处方和制造工艺的设计和选择需要全面理解生物药剂学。

表 1 药物设计中需要考虑的生物药剂学因素

活性药理成分（API）	稳定性	纯度
	溶解度	盐的形式
	pH 和 pK _a	粒径
	晶型（多晶化合物）	配位剂
	辅料相互作用和相容性	
剂型	剂型（胶囊、片剂、溶液等）	稳定性
	速释或缓控释	辅料
	剂量	生产变异性
	生物利用度	
生理因素	给药途径	血流
	药物跨膜渗透性	表面积
	与大分子结合	生物降解
药效学和药动学	生物利用度	药代动力学
	治疗目的	剂量
	副反应	毒性作用
生产中考虑的因素	生产方法与工艺	成本
	质量控制与保证	稳定性测试
	原料质量标准	
患者方面要考虑的	依从性、标签和产品接受度	费用

各个给药途径的药品设计需要考虑特定的生物药剂学因素（表 2）。药物从血管外部位吸收至全身，受给药部位的解剖及生理性状，以及原料药及制剂的理化性质的影响。口服用药设计中要考虑到胃肠道（GI）解剖学、生理学性状和内容物的影响；设计用于治疗真菌感染的阴道片处方时，需要考虑的因素包括组分是否与阴道解剖及生理特点相容，药物是否能通过阴道吸收入血循环，以及如何放置在合适的位置以达到优化治疗效果的目的；在眼科用药方面需要考虑 pH、等渗性、无菌性、对角膜的局部刺激性及被泪液的消除，还有全身吸收等。一个需要额外考虑的因素是药物与角膜的接触时间。虽然增加眼药水的黏度可以增加药物与角膜的接触时间，但使用黏稠产品可能造成患者视力模糊；肌内注射溶液要考虑的生物药剂学因素包括局部刺激性、药物溶解性和药物在注射部位的吸收。

表 2 常见给药途径

给药途径	生物利用度	优点	缺点
注射途径			
静脉注射 (IV)	完全吸收, 给药速度被认为是即时的	药物起效快	增加了副反应发生的概率, 可能致过敏
静脉滴注 (IV inf)	完全吸收, 给药速度取决于输液泵	精确控制血药水平, 可以注入大体积药液; 适用于水溶性差及刺激性药物	需要技能和插入注射装置; 注射部位组织损伤包括渗漏, 坏死, 脓肿; 刺激性药物导致疼痛
肌肉注射 (IM)	水溶液吸收快; 油溶液吸收慢	比静脉注射简单; 注射体积较皮下注射大	吸收速度取决于肌肉组织和血液灌注
皮下注射 (SC)	水溶液吸收快, 储库型制剂吸收慢	通常用于胰岛素注射	药物吸收速度取决于血流灌注和注射体积
消化道途径			
舌下或面颊不吸收 (SL)	脂溶性药物吸收快	无首过效应	部分药物可能被吞咽。大多数药物不适合, 也不适于大剂量药物
口服 (PO)	吸收变化大, 通常比 IV 和 IM 注射慢	最安全和简便的给药途径; 适用于速释和控制释放的药物	一些药物可能吸收不稳定, 或在胃肠道中不稳定; 或在进入体循环前发生肝内代谢
直肠 (PR)	栓剂吸收差异大, 灌肠剂吸收较好	当病患吞咽困难时尤其有用; 适用于局部和全身给药	吸收不稳定; 栓剂可能移行至其他部位; 一部分患者不适
其他途径			
透皮	吸收慢, 速度变化大, 覆盖阻隔层时吸收增加	透皮给药系统 (贴剂) 使用方便; 适用于低剂量脂溶性的小分子药物	一些由贴剂或药物引起的刺激性。皮肤透过性随环境、解剖位置、年龄和性别而改变。乳剂类型和油膏基质影响药物释放和吸收
吸入	快速吸收, 给药量可变化	适用于局部和全身给药	药物粒径决定其在呼吸道的位置。可能引起咳嗽反射, 一些药物被吞咽

生物药剂学研究可采用体内或体外方法 (表 3)。体外方法^[2~6]用来考察药物及药品的物理化学性质和评价药品生产过程中的质量。最终药物必须通过人体试验来评价疗效, 包括药效动力学、药代动力学、治疗-毒性曲线。药物溶出、吸收、代谢以及药物与食物及其他胃肠道内容物相互作用等是药物开发中研究和注册方面主要考虑的生物药剂学因素。

表 3 体内和体外药剂学研究示例

生物药剂学研究 (体内)	生物利用度研究	测定药物在血浆, 尿液或其他组织中的浓度
	急性药理效应	测定药效作用, 如 FEV1、血压、心率、皮肤苍白
	临床研究	测定药效
生物药剂学研究 (体外)	药物释放/溶解	测定药物在特定条件下的溶解速率
	药物渗透性	将 CACO2 细胞 (分离的结构细胞) 培养成膜, 用此研究药物对肠道的渗透性和肠道对药物的代谢作用
	药物生物转化 (代谢)	利用肝细胞、匀浆或分离的细胞色素 P450 同工酶, 研究生物转化

静脉给药认为是完全或 100% 利用的, 因为药物是直接进入体循环的。通过谨慎选择给药途径和适当的药品设计, 生物利用度可以根据治疗目的从快速而完全吸收到慢速恒速吸收, 甚至完全无吸收而变化。药物吸收进入体循环后通过正常生理过程将药物分布和消除, 这个过程通常不受特定处方的影响。药物释放和吸收的速率对决定药物作用的开始、强度和持续时间起着重要作用。

口服药物吸收的限速步骤

药品中药物的全身性吸收由一系列连续的速率过程组成 (图 2)。如口服的固体速释药品 (如片剂、胶囊), 速率过程包括: ①制剂的崩解和释放; ②药物在体液中的溶解; ③药物通过细胞膜被吸收入体循环。药物进入体循环的速度取决于药品的崩解、释放和吸收中最慢的步骤。

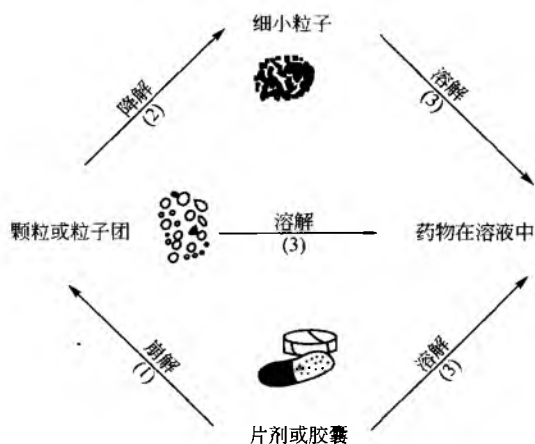


图 2 口服片剂或胶囊后过程示意图

动力学过程中最慢的一步为限速步骤。除了控释药物, 口服药物崩解往往比药物溶解和吸收速度快得多。对于水溶性很差的药物, 药物溶解通常是最慢的过程, 因此在药物吸收中产生限速作用。相反地, 对于水溶性好的药物, 药物溶解迅速, 而药物透过细胞膜的过程最慢, 成为限速步骤。

影响药物吸收的生理因素

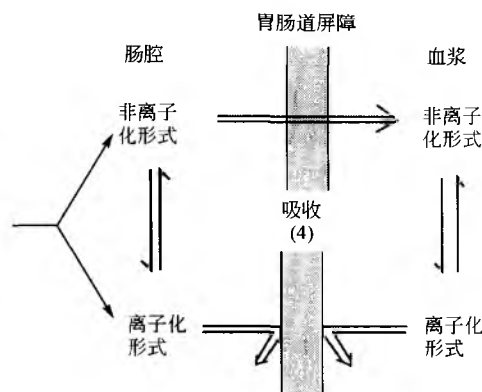
1. 药物透过细胞膜的途径

全身吸收药物必须从给药部位穿过一层或多层细胞而进入体循环。药物在吸收部位进入体循环的渗透性与药物分子结构和细胞膜的物理及生化性质密切相关。药物吸收入细胞必须穿过细胞膜。跨膜吸收是药物通过细胞的过程。一些极性分子可能无法透过细胞膜, 但可以通过细胞间隙或者说是细胞间的“紧密连接”, 这个过程称细胞间吸收。一些药物可能通过混合机制吸收。

1.1 被动扩散

被动扩散是指药物自发地从浓度高的区域向浓度低的区域扩散, 这个过程不需要外加能量, 因而是被动的。

药物分子随机地向前或向后穿过细胞膜 (图 3), 如果两侧药物浓度相等, 向前运动的分子与向后运动的分子持平, 总体没有药物转运。如果一侧具有较高的药物浓度, 那么向前运动的分子将多于向后运动的分子, 导致药物向着浓度低的区域转运, 如图 3 中大箭头所示。流量是药物



转运速度, 用一个向量表示它的方向。分子倾向于随机向各个方向运动, 因为分子具有动能, 在空间发生频繁碰撞。图 3 仅显示了分子向左和向右的运动, 因为其他方向运动因容器壁的限制不会导致浓度变化。

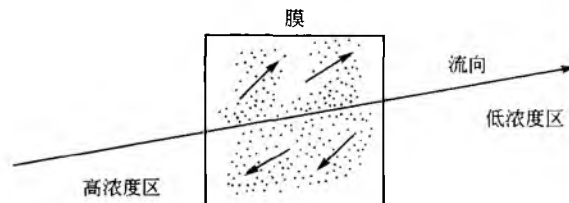


图 3 分子被动扩散。分子在溶液中随机向各个方向扩散, 当分子从左向右的扩散抵消反方向的运动时, 就发生从高浓度区向低浓度区的净扩散。流量以单位时间通过的物质计算^[1]

被动扩散是大多数药物跨膜转运的主要途径。被动扩散的动力是药物在细胞膜两侧的浓度差。根据 Fick 扩散定律, 药物分子从高浓度向低浓度扩散。

$$dQ/dt = (DAK/h)(c_{GI} - c_P)$$

式中: dQ/dt 为扩散速率; D 为扩散系数; K 为分配系数; A 为细胞膜表面积; h 为膜厚度; $c_{GI} - c_P$ 为胃肠道和血浆药物的浓度差。

药物进入体循环后快速分散在大体积中, 血液浓度相对于给药部位浓度极低。药物通常是毫克剂量, 而血药浓度在每毫升微克至纳克数量级。对于口服药物 $c_{GI} \gg c_P$, 高浓度梯度推动药物分子从胃肠道进入血浆。

如 Fick 扩散定律所示, 药物脂溶性、细胞膜表面积和厚度影响被动扩散的速度。分配系数 K 表示药物的脂水分配比。理论上药物脂溶性越强, K 值越大, 吸收越好。实际上, 药物吸收受药物其他物理性质的影响, 故限制了分配系数的实际应用。药物吸收的膜面积直接影响药物的吸收速度。药物在胃肠道的大多数部位都能吸收, 然而小肠的十二指肠区显示了最大的药物吸收速度, 这是因为其解剖结构特征, 绒毛和微绒毛提供了大的表面积, 在胃肠道其他部位没有绒毛。

吸收部位细胞膜厚度 h 是一个常数, 但有可能因疾病而变化。通常血管中药物能很快透过毛细血管膜进入组织。在大脑中, 毛细血管紧密地连接神经胶质细胞, 形成了一个厚厚的脂质屏障 (血脑屏障), 阻止了药物扩散进入大脑。在某些疾病状态下 (如脑膜炎), 细胞膜可能被破坏或对药物扩散更具渗透性。

很多药物分子结构中有亲水和亲脂基团。脂溶性更好的药物穿过细胞膜比脂溶性较差 (即水溶性更好) 的容易。对于弱电解质药物 (如弱酸、弱碱), 电离程度影响药物的溶解性和转运速率。离子化的药物比非离子化的更易溶于水, 而后者脂溶性更好。弱电介质的电离程度取决于药物的 pK_a 和溶解介质的 pH。Henderson-Hasselbalch 方程描述了药物离子化和非离子化的比值与环境 pH 和药物的 pK_a 之间的关系。

$$\text{弱酸 比值} = \frac{[\text{盐}]}{[\text{酸}]} = \frac{[A^-]}{[HA]} = 10^{pH-pK_a}$$

$$\text{弱碱 比值} = \frac{[\text{碱}][\text{盐}]}{[\text{RNH}^+][\text{RNH}^+]} = 10^{pH-pK_a}$$

根据 pH, 弱酸 (如水杨酸) 在胃 ($pH=1.2$) 内能很快吸收, 因为存在有利的非离子化药物 (脂溶性更好) 的浓度梯度, 实际上所有的水杨酸在血液 ($pH=7.4$) 中都是解离的。弱碱 (如奎尼丁) 在酸性条件下高度离子化, 在胃中吸收很少。虽然大多数药物服从 pH 规律, 而实际上主要吸收部位在小肠 (十二指肠), 原因是其具有较大的表面积和丰富的血流。

药物在膜两侧的浓度也受到药物和组织亲和性的影响, 组织亲和性阻止药物透过细胞膜转运回去。例如, 与血浆蛋白或组织蛋白结合引起药物在该区域富集。双香豆素和磺胺类药物和血浆蛋白强烈结合; 氯丹, 一种脂溶性的杀虫剂, 分配并富集在脂肪组织中; 四环素与钙结合成复合物聚集在骨骼和牙齿中。药物可能因为特殊吸收或主动转运而在组织中聚集。如甲状腺组织对碘的吸收, 细胞内液对钾的吸收和肾上腺素储藏组织对儿茶酚的吸收。

1.2 载体介导转运

理论上脂溶性药物能穿过或绕过细胞。对于相对分子质量较小的亲脂性药物, 细胞膜不会成为其扩散和吸收的屏障。在肠道中, 相对分子质量小于 500 的分子能通过细胞吸收。体内存在大量特异性的载体介导的转运系统, 尤其是在肠道中存在吸收离子和机体必须营养的系统。

主动转运: 主动转运是载体介导的跨膜转运过程, 对胃肠道吸收某些药物很重要, 肾及胆汁排泄药物及其代谢

物也存在主动转运过程。载体连接药物形成载体-药物复合物, 运送药物穿过细胞膜并在另一侧将药物释放出来 (图 4)。主动转运是以逆浓度梯度为特征的过程, 即将药物从低浓度区向高浓度区转运, 需要消耗能量。

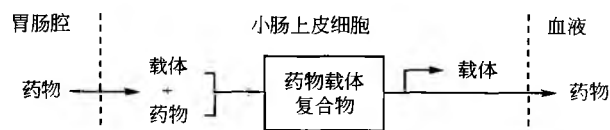


图 4 理论载体易化扩散示意图^[1]

如果药物分子类似被主动转运的天然底物, 那么它就有可能被主动转运。一些类似于生理代谢物的脂不溶性药物 (如 5-氟尿嘧啶) 就是通过主动转运被吸收的。结构类似的药物在吸收部位可能竞争载体。这是因为载体的数量是有限的, 载体的结合位点在高浓度药物下可能饱和。相反, 被动转运不会出现饱和。

促进扩散: 促进扩散是由载体介导的不需要能耗的过程, 药物沿浓度梯度输送 (从高浓度区向低浓度区转运)。促进转运具有可饱和性和结构选择性, 具有类似结构的药物表现为竞争动力学过程。促进扩散在药物吸收的作用似乎不甚重要。

载体介导的肠道转运: 在肠道的刷状缘和基底膜上存在多种吸收特定离子和身体必须营养素的载体转运体系 (载体)。许多药物因为和天然底物具有类似的结构而被载体吸收。P-糖蛋白, 一种肠道跨膜蛋白, 似乎能减少多种亲脂性药物和细胞毒性药物的肠道上皮细胞渗透性。肠道内也存在其他的载体, 如多种头孢菌素是通过氨基酸转运载体吸收的。

1.3 膜泡转运

膜泡转运是细胞吞没颗粒和溶解物质的过程。胞饮涉及吞没小分子溶液或液体, 而吞噬主要指巨噬细胞吞没大颗粒和大分子。内吞和分泌分别指大分子进入和移出细胞的过程。

胞饮或吞噬过程中, 细胞膜内陷包围被吞噬物, 接着将它吞入细胞内。然后含有被吞噬物质的细胞膜在细胞内形成小泡或小囊。膜泡转运参与口服沙宾疫苗和各种大分子蛋白的吸收。胰岛素从胰腺分泌细胞转运到细胞外的过程就是胞外分泌的一个例子。胰岛素分子首先被包入细胞内小泡, 然后与质膜融合, 将胰岛素释放到细胞外。

口服吸收

1. 生理因素

药物可以通过多种途径服用 (表 2)。除了静脉给药, 药物要从给药部位吸收进入人体循环, 而且受给药部位环境影响大。

口服给药是最普通的给药途径。胃肠道体系生理过程主要包括分泌、消化和吸收。分泌包括转运液体、电解质, 多肽和蛋白进入消化腔。唾液酶和胰酶参与碳水化合物和

蛋白的消化,其他分泌物如黏液保护消化腔内表面。消化是将食物组分降解成可供吸收的小结构片段。药物和食物组分主要在近端小肠(十二指肠)被吸收。吸收是指组分从肠腔进入体内的过程。吸收可以看成是从消化道腔到血和从血到消化道腔两个过程的总结果。

口服药物经过消化道各个部位,包括口腔、食道和胃肠道各个部分,残渣最终从肛门排出体外。药物在消化道

各个部位,包括舌下、面颊、胃肠道和直肠,都可能以被动扩散的方式吸收。对大部分药物而言,口服给药后最佳的吸收部位是小肠上端或十二指肠。十二指肠独特的解剖结构为被动扩散提供了极大的表面积(表4)。此外,十二指肠区存在一个丰富的毛细血管灌注网络,它起着维持从肠腔到血循环的浓度梯度的作用。

表4 药物的胃肠道吸收

解剖位置	功能	对药物吸收的影响
口腔	唾液 pH 为 7,含淀粉酶(唾液淀粉酶)能消化淀粉。黏蛋白是一种糖蛋白,润滑食物,可能与药物发生作用	脂溶性药物口腔和舌下吸收
食道	食道连接咽和贲门, pH 5~6。食道下端有食道括约肌,具有防止胃反酸的功能	药片或胶囊可能在这个部位滞留,造成局部刺激。药物在食道溶出极少
胃	禁食状态 pH 为 2~6。进食情况下 pH 为 1.5~2,这是胃壁细胞分泌盐酸的结果。胃酸分泌由胃泌素和组胺激动。食物在胃窦内激烈混合挤压,这个使食物大颗粒崩解的过程称为胃研磨。食物和液体通过舒张幽门括约肌进入十二指肠	药物在胃内不能有效吸收。碱性药物迅速溶于酸。胃排空影响药物到达小肠的时间。食物组成和渗透度受胃排空的影响,脂肪酸延迟胃排空,高密度食物通常胃排空较慢
十二指肠	胰和胆管通过相同的通道进入十二指肠。因为碳酸盐中和胃酸,十二指肠 pH 为 6~6.5, pH 条件适合酶解蛋白和多肽食物。胰液含有酶,通过胆管排泌进入十二指肠。胰岛素酶、糜蛋白酶和羧肽酶参与蛋白降解到氨基酸。胰脂肪酶将脂类变为脂肪酸	药物吸收的主要部位。绒毛和微绒毛构成了刷状缘从而形成了巨大的表面积,有利于被动扩散。高血流灌注维持了从肠道到血液循环的浓度梯度。复杂的液态介质溶解多种水溶性有限的药物。酯类前药在吸收过程中水解。蛋白水解酶能降解多种蛋白的药物,造成吸收不足。酸性药物溶解于碱性 pH。胆汁分泌帮助溶解脂肪和亲脂性药物
空肠	空肠是小肠中介于十二指肠和回肠间的部分。在接受胰液和胆汁后蛋白和碳水化合物的消化在空肠中继续进行。这段小肠收缩较十二指肠小,适宜做体内药物吸收的研究	药物主要以被动扩散而被吸收
回肠	回肠 pH 约为 7,末梢高达 8,是小肠的末端。收缩比十二指肠小。回盲瓣将小肠与大肠分开	药物主要以被动扩散而被吸收
大肠	大肠 pH 为 5.5~7,分泌黏液作为润滑剂和保护剂。大肠含有能代谢某些药物的需氧和厌氧的微生物。Corhn 综合征使大肠肠壁增厚,微生物群变得更厌氧。导致氯林可霉素和普罗帕酮吸收增加,其他药物吸收减少	由于没有微绒毛和内容物黏度增加和半固体性质只有极有限的药物被吸收。一些药物如茶碱和美多普洛有吸收。在大肠吸收良好的药物,可作为口服缓释制剂的优先选择
直肠	直肠约 15cm,终于肛门。无排泄物存在时,内有少量液体(约 2mL) pH 约为 7。它由直肠上、中、下静脉灌注。直肠下静脉(靠近肛门括约肌)和直肠中静脉通过下腔静脉回心。直肠上静脉进入肠系膜循环由门静脉入肝	药物吸收变化大,取决于药栓和药物溶液在直肠内的位置。一部分药物可能通过直肠下静脉而吸收,药物直接进入体循环。而另一些药物通过直肠上静脉吸收,药物入肠系膜静脉,通过门静脉入肝而发生代谢

整个转运时间,包括胃排空和小肠及结肠的转运,长达 0.4~5d。大多数健康受试者小肠转运时间为 3~4h。如果药物离开小肠时吸收仍没有完成,那么它的吸收就可能有问题或不完全。小肠通常充满消化液,它们保持肠腔的流体状态。与之相反,液体在结肠被重吸收,结肠内容物为半固体或固体,这种环境很难使药物进一步溶解。

1.1 胃肠道运动

药物一旦口服,那么它在胃肠道的准确位置和所处环境是难以确定的。胃肠道运动倾向于推动药物在消化道向前运动,因而药物可能不在吸收部位停留。口服药物可能存在解

剖上的吸收窗,在这个部位药物能有效吸收。非生物降解控释剂型中的药物必须在到达大肠之前完全释放入吸收窗。药物在胃肠道的转运时间取决于药物的药理性质、剂型和各种生理因素。药物在胃肠道内的生理运动取决于消化道是否摄取了食物(消化或进食状态)、禁食或消化暂停状态。

1.2 胃排空时间

药物口服后很快就到达胃。因为十二指肠具有强大的吸收能力,胃排空延迟将会减慢药物在十二指肠的吸收速度并可能减少吸收程度,从而延缓药物的起效时间。在酸中不稳定的药物,如青霉素,可能因为胃排空的延迟而降解。有些药物,如

阿司匹林,可能因为与胃接触时间延长而刺激胃黏膜。

延迟胃排空的因素包括摄入高脂肪的食物、冷饮料和抗副交感神经作用的药物。液体和小于 1mm 的微粒通常在胃内无滞留。这些微粒会因为基础压力而排空进入十二指肠。不同组成的食物以不同的速率从胃内排空。例如,液体通常比被消化的固体食物排空快;大颗粒,包括片剂和胶囊,因为食物而延迟排空可达 3~6h。不能被消化的固体在非消化期排空非常慢,在此期间胃内没有食物,胃运动减弱,但会因为胃周期性的收缩而将内容物排出。

1.3 肠蠕动

正常蠕动使十二指肠内容物混合并使药物颗粒与肠黏膜细胞紧密接触。药物必须在吸收部位停留足够的时间以达到较好的吸收。在肠道高速蠕动的状态下,如痢疾时,药物停留很短没有足够的时间被充分吸收。

1.4 胃肠道血液灌注

血流对携带药物从被吸收部位进入体循环很重要。一个巨大的毛细血管网和淋巴管网灌注着十二指肠区和腹膜。该内脏循环消耗了心输出量的 28%,餐后这个数字还会增加。药物从小肠吸收进入肠系膜血管,接着流向肝门静脉,然后入肝最终进入体循环。任何导致肠系膜血流减少的疾病,如

充血性心衰,都将降低药物从肠道吸收进入体循环的速度。

一些药物可以通过微绒毛下的淋巴小结或淋巴管吸收进入淋巴循环。药物通过淋巴循环吸收因为不经过肝门静脉而避开了肝脏代谢的首过效应。淋巴对吸收饮食中的脂类很重要并可能参与一些亲脂性药物的吸收,如博来霉素和阿克拉霉素溶解于乳糜微粒,通过淋巴系统吸收进入体循环。

2. 食物和其他因素对胃肠道药物吸收的影响

消化后的食物可能影响肠道 pH 和对药物的溶解性。食物的影响并不总是可预测的。食物能减少一些抗生素(如青霉素、四环素)的吸收,而高脂饮食会导致一些药物(如灰黄霉素)吸收增加。肠道食物刺激胆汁分泌,胆汁含有胆酸。胆汁是一种表面活性剂,它参与脂肪的消化和溶解,并通过形成微乳增加脂溶性药物的溶解性。对于一些溶解性不良的脂溶性药物(如肉桂苯哌嗪),食物刺激盐酸分泌而降低 pH,形成加快药物溶解和吸收的效果。

一般而言,患者在禁食状态下大量喝水后药物的生物利用度较好(图 5)。然而,为了减少对肠黏膜的刺激性,一些药物如红霉素、金霉素盐类、阿司匹林和非甾体抗炎药(NSAID)必须与食物同服。这些药物在有食物的时候吸收速度可能降低,但是吸收的程度却是一样的。

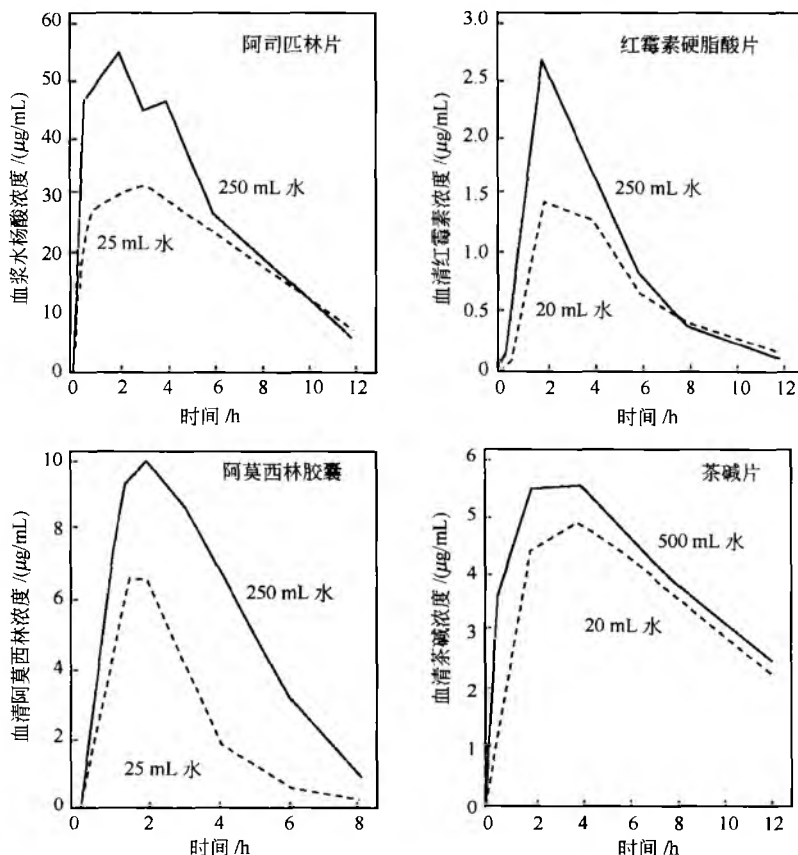


图 5 禁食口服阿司匹林片 (650 mg)、红霉素硬脂酸酯片 (500 mg)、阿莫西林胶囊 (500 mg)、茶碱片 (260 mg) 与服大量水后平均血浆或血清药物水平 ($n=6$)

剂型也可能受食物的影响。例如，肠溶包衣的片剂可能因为胃排空的延迟在胃内停留过长的时间。如果肠溶包衣片没有快速地到达十二指肠，药物释放和随后的吸收就被延迟了。与此相反，肠溶包衣微球或微粒分散在胃内受食物的影响就小些，十二指肠吸收更加稳定。食物可能影响剂型的完整性，从而改变药物释放速度。例如，24h 控释的茶碱片剂在饮食条件下吸收比禁食要快得多（图 6）。^[7]

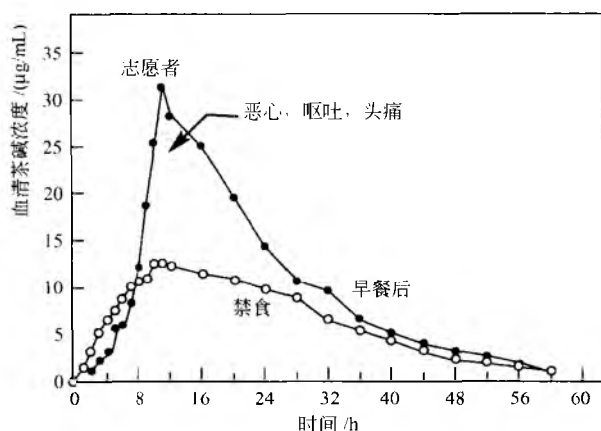


图 6 一名受试者在禁食状态下服用 24h 剂量 (1500mg) 的茶碱后血清药物水平。试验期间受试者感到恶心，反复呕吐，悸动性头痛。进食后药物释放模式不变^[7]

一些药物如雷尼替丁、雷米替丁和双嘧达莫口服后药时曲线产生双峰。双峰现象通常在禁食患者单剂量给药后出现。双峰现象可能是胃排空的差异、肠运动的变化、食物、肠肝循环或剂型失败造成的。水溶性好的药物在胃内溶解，部分排空进入十二指肠形成第一个吸收峰。胃排空延迟导致剩余的药物进入十二指肠形成第二个吸收峰。

一些改变胃肠道生理的疾病如克罗恩病及校正性外科手术包括胃溃疡校治、胃与十二指肠吻合术和选择性迷走神经切断术都可能对药物吸收产生潜在影响。在许多疾病状态下药物的吸收不可预测。药物及营养成分可能影响其他药物的吸收，例如，溴化普洛舍啉是一种抗副交感神经生理作用药物，能减慢胃排空和肠蠕动，并可能减少胃酸分泌。柚子汁能抑制多种药物肝内代谢，从而增加其血药水平。

影响生物利用度的生物药剂学因素

在设计和生产一个能输送活性药物并取得期望的生物利用度的药物产品过程中，需要考虑以下生物药剂学因素：①药品的种类（如溶液、混悬液、栓剂）；②药品中辅料的性质；③药物分子的物理化学性质；④给药途径。

1. 崩解

速释口服固体药品必须迅速崩解成小颗粒并释放药物。美国药典（USP）描述了片剂崩解的法定测试方法。崩解

并不意味着片子或药物的完全溶出。美国药典对完全崩解做了如下描述：除了不溶性的包衣碎片，片剂在测试仪筛网上的残余物均应柔软，没有明显硬核。美国药典对片芯、素片、肠溶片、口腔片和舌下片分别做了单独的规定。咀嚼片和缓释、控释及延长释放或反复作用的药品免做崩解试验。

崩解试验准确评价了固体制剂中碎片、颗粒和残余聚集物，但是不能提供药物溶出的信息。崩解试验是控制片剂生产质量的一部分。

2. 溶出

溶出是化学物质或药物溶解于溶剂的过程。在生物体中，药物溶解于水性介质是吸收的重要先决条件。溶解不良的药物在胃肠道从完整剂或崩解后的固体制剂中的溶出速率通常决定了它的吸收速率。因此，溶出试验是判断影响药品生物利用度的处方因素。

随着药物颗粒溶解，颗粒表面形成了一个饱和层（静止层）。饱和层的药物逐步向周围区域扩散。药物溶解速率可以用 Noyes-Whitney 方程来描述，它模拟了药物从表面向溶剂扩散的速度。通常表面的药物浓度假定是最高的，如药物在溶剂的溶解度。药物浓度 c 为溶液内的均一浓度，且通常低于紧挨固体表面静止层的药物浓度。静止层周围药物浓度下降称为扩散梯度。

$$dc/dt = DA(c_s - c)h$$

式中： dc/dt 为扩散速度； D 为扩散常数； A 为微粒表面积； c_s 为静止层药物浓度； c 为溶液中药物浓度； h 为静止层厚度。

溶出速率 $(dc/dt) \times (1/A)$ 是单位面积单位时间药物的溶出量。

Noyes-Whitney 方程显示溶出速率受药品物理化学性质、处方和溶剂的影响。此外，介质的温度也影响药物的溶解度和溶出速率。

药品的理化性质

胃肠道固有的 pH 环境从胃内酸性变化到小肠内弱碱性。药物溶解度可能由于加入酸性或碱性辅料而有所改善。例如，阿司匹林的溶解度在加入碱性缓冲液后得到提高。控释制剂是不崩解的，在控释制剂处方中加入缓冲物质是为了减慢或调节速释药物从制剂中释放的速度。缓冲物质缓慢释放，因此药物在胃肠道环境中不会迅速释放。溶解度差的药物很难制成静脉注射溶液。物理或化学性质不稳定的药物，在包衣或生产过程需要加入一些特殊辅料，以防止药物降解。

1. 稳定性、pH 和药物吸收

pH-稳定性曲线代表药物降解反应速率常数对 pH 的关系，可以用来预测一些在胃肠道内发生降解的药物。红霉素的稳定性是 pH 依赖性的。在酸性介质中红霉素降解

迅速，而在中性或碱性环境中相对稳定。因此，红霉素片可采用肠溶包衣，以防止在胃内酸解。此外，有人制备了在胃内稳定性好一些但溶解度差的红霉素盐。

2. 粒径和药物吸收

减少粒径可以显著地增加药物的有效表面积。药物溶出被认为是发生在溶质表面的，因此表面积越大，药物溶出的速率越大。药物颗粒的几何形状也影响表面积，而且在溶出过程中表面积是不断变化的。在计算溶出时，溶解物的几何尺寸假定是不变的。

粒径和粒径分布研究对水溶性差的药物具有重要意义。通过碾磨微粉化减少药物颗粒的粒径，能增加低水溶性药物的吸收，如灰黄霉素、呋喃妥因和甾体类药物。减少粒径而增加微粒的总表面积，能增加水分的渗透和溶出速率。对于水溶性差的药物，处方中可以加入崩解剂，确保片子快速崩解并释放药物颗粒。

3. 多晶型、溶剂化物和药物吸收

多晶型是指药物存在多种晶体形式。各晶型具有相同的化学结构但是物理性质却不相同，如溶解度、密度、硬度和可压性。一些晶型比无定形溶解度差，造成吸收不完全。氯霉素有不同晶型，混悬液口服时体内药物浓度取决于 β 晶型所占的比例。 β 晶型溶解和吸收较好（图7）。一般而言，自由能最低的晶型是最稳定的。亚稳态的晶型时间长，可向更稳定的晶型转化。晶型改变可能会影响生产。例如，药物晶型转变可能造成裂片，甚至颗粒不能压成药片，以致需要修改处方。一些药物在生产过程中与溶剂相互作用形成一种叫做溶剂化物的晶体。水可以参与形成一种特殊的晶体，称为水化物。又如，红霉素可以形成多种水化物^[8]，而且与无水化物相比溶解度差异很大（图8）。再如，据报道氨苄西林三水合物吸收较无水物差，这是因为后者溶出较快。

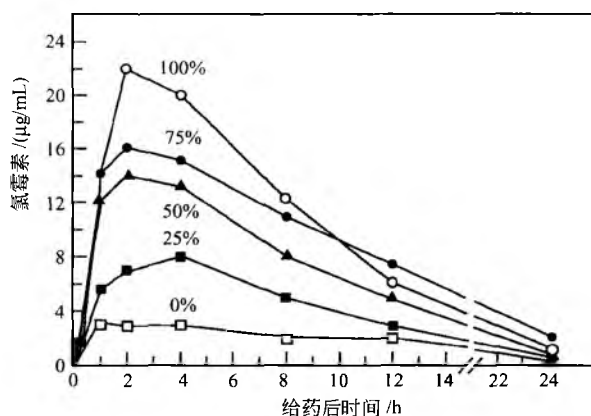


图7 相同剂量，不同 α 、 β 晶型比例氯霉素棕榈酸盐混悬液给药后平均血药水平比较^[9]

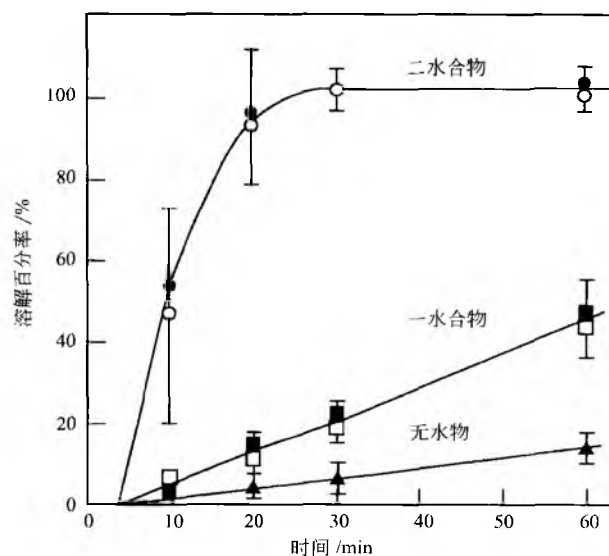


图8 红霉素二水、一水及无水物在磷酸盐缓冲液（pH=7.5）37℃下溶出行为比较^[8]

影响药物溶出的处方因素

辅料是没有药理活性的处方添加剂，用来赋予药物和剂型一定的功能性质。添加辅料可以改善药物的可压性，提高稳定性，减少胃刺激，控制药物吸收速度，增加生物利用等等。一些用于固体和液体制剂的辅料如表5和表6所示。固体制剂使用的辅料包括：①填充剂（如乳糖）；②崩解剂（如淀粉）；③润滑剂（如硬脂酸镁）；④其他成分，如黏合剂和稳定剂。使用辅料不当可能改变药物生物利用度甚至药效。

表5 固体药物常用辅料^[1]

辅料	剂型中的作用
乳糖	稀释剂
磷酸二氢钙	稀释剂
淀粉	崩解剂，稀释剂
微晶纤维素	崩解剂，稀释剂
硬脂酸镁	润滑剂
氢化植物油	润滑剂
滑石粉	润滑剂
蔗糖（溶液）	黏合剂
聚乙烯吡咯烷酮（溶液）	黏合剂
羟丙甲纤维素	溶剂包衣材料
二氧化钛	与染料混合体，包衣着色剂
甲基纤维素	包衣材料或黏合剂
邻苯二甲醋酸纤维素	肠溶包衣

表 6 口服溶液剂常用辅料^[1]

辅料	在剂型中的作用
羟甲基纤维素钠	助悬剂
西黄蓍胶	助悬剂
海藻酸钠	助悬剂
黄蓍胶	触变剂或助悬剂
硅酸铝镁	触变剂或助悬剂
山梨醇	甜味剂
乙醇	溶剂, 防腐剂
丙二醇	溶剂
	防腐剂
淀粉	甜味剂
	表面活性剂
芝麻油	乳剂溶媒
玉米油	乳剂溶媒

辅料可以通过改变药物的溶出介质或直接与药物反应来改变药物的溶出。一些常见的影响药物溶出和生物利用度的问题如表 7 所示。例如, 一些助悬剂能增加药物介质的黏度, 但可能减慢药物从混悬液中的溶出。处方中过量使用硬脂酸镁(一种疏水性润滑剂)能延迟药物的溶出并减慢药物吸收速度, 药物吸收的总量也可能减少。为了避免这种问题, 润滑剂的量必须减少或选用其他合适的品种。有时增加崩解剂的量能克服润滑剂对药物溶出的延迟效应。然而, 对于一些水溶性差的药物而言, 增加崩解剂的量对增加药物溶出起效甚微或根本无效, 这是因为细小的药物颗粒没有润湿。几个常见辅料对口服药物生物利用度参数影响见表 7。

表 7 辅料对口服药物药动学参数的影响¹⁾

辅料	举例	K_a	T_{max}	AUC
崩解剂	微晶纤维素	↑	←	↑/—
润滑剂	滑石粉, 氢化植物油	←	↑	←/—
包衣材料	羟丙基纤维素	—	—	—
肠溶包衣材料	邻苯二甲酸醋酸纤维素	←	↑	←/—
缓释制剂材料	甲基纤维素, 乙基纤维素	←	↑	←/—
缓释制剂材料(蜡质)	蓖麻蜡, 聚乙二醇	←	↑	←/—
缓释制剂材料(胶质/黏性)	胶体硅酸铝镁/海藻酸钙铵	←	↑	←/—

1) 这可能是浓度和药物决定的, 其中 ↑ = 增加, ← = 减少, — = 无效, K_a = 吸收速率常数, T_{max} = 血浆中达到药物浓度峰值的时间, AUC = 药时曲线下面积。

辅料可以增加或减少药物吸收的速度和程度。增加药物水溶性的辅料通常会增加药物的溶解度和吸收。例如处

方中的碳酸氢钠能改变药物的介质环境。阿司匹林为一种弱酸, 在碱性介质中能形成水溶性盐而快速溶出, 这个过程被称为在反应介质中的溶出。当固体颗粒周围有反应性介质时, 药物溶出迅速。随着溶解的药物分子向溶液内部扩散, 药物可能以极小的颗粒析出。小颗粒有极大的表面积, 分散和再溶出迅速, 黏膜接触吸收加快。

辅料能与药物分子直接作用而形成水溶性或水不溶性的复合物。如果在四环素处方中加入碳酸钙, 将会形成一种水不溶性的四环素钙盐, 使其溶出速度减慢, 吸收变差。

辅料能增加药物在胃肠道的停留时间, 因此增加了药物的吸收量。辅料可能作为载体增加药物扩散透过肠壁。加入表面活性物质能增加润湿和药物的溶解性。相反, 有很多辅料阻碍药物溶出, 从而减少药物吸收。

用作片剂包衣的虫胶老化后可能减慢药物溶出速度。表面活性剂对药物溶出的影响有时难以预测。低浓度的表面活性剂能降低表面张力而加快药物溶出, 而浓度高时倾向于与药物形成胶束, 从而减慢药物溶出。没有足够崩解剂而压力过大时, 片剂可能在体内崩解困难。

体外溶出试验

体外溶出试验评价的是制剂含有一种或多种辅料时, 药物在水溶性介质中溶出的速度和程度。一些潜在的生物利用度问题可以被适当的溶出方法所揭示。不同处方的最佳溶出条件是不一样的。要尝试使用不同转速、介质(包括 pH)和溶出装置以确定哪种试验方法是最适合于该药物的, 并能区别制剂处方的改变。然后用该药品适当的溶出试验条件来制定溶出度标准。

溶出杯的尺寸和形状可能影响药物溶出的速度和程度。例如溶出杯尺寸从数毫升到数升, 它的形状可是圆底或平底, 因而药片可以在不同试验中停留在不同位置。转速和搅拌桨的形状可影响药物溶出速度。搅拌速度必须控制, 不同药品有不同要求。低搅拌速度(50~100r/min)比高速对处方因素更有区分度。溶出介质的温度必须控制, 避免温度波动。大多数溶出试验在 37℃ 下进行。

溶出介质的性质、药物溶解度和药物剂量会影响溶出试验。溶出介质不应当被药物饱和。通常在上述试验中溶出介质的量必须大于完全溶解药物所需量的。常见的介质体积为 500~1000mL。水溶性不好的药物需要用一个大体积的溶出杯(达 2000mL)才能观察到明显溶出。漏槽条件是指过量的介质允许药物不断溶出。如果药物溶出饱和, 净溶出就停止了。根据美国药典规定介质的量必须不少于 3 倍药物饱和溶液介质量。

确定哪种介质最适合的是一个反复论证的过程。美国药典推荐的溶出介质为脱气的水, 如果因药物或处方的溶解度需要, 也可使用缓冲盐溶液(通常 pH 为 4~8)或稀释的 HCl。介质脱气的作用要确认。一些研究者根据药物的性质和药物在胃肠道设计释放部位, 使用了 0.1mol/L HCl、0.01mol/L HCl、磷酸盐缓冲液、人工胃液、水和人

工肠液。没有哪一个溶出仪和测试方法适用于所有的药物。每个药物必须采用与法定的生物利用度最相关的溶出度条件单独进行测试。

溶出度试验通常规定一定百分比的标示量药物必须在特定时间内溶出。在实际操作中,不同药片所含的药物绝对量不一样。因此,测定每批多片药物获得该药品代表性的溶出速率。《美国药典》提供了一些法定的方法来进行片剂、胶囊和其他药品如透皮制剂的溶出试验。方法选择在不同药物专论里有特定说明。

生物利用度和生物等效性

生物利用度和生物等效性可以直接用药时曲线、尿药排泄研究、急性药理作用研究、临床研究或体外研究获得。生物利用度测试适于批准的药物活性成分或未被 FDA 批准上市的治疗成分。药物活性成分或治疗成分的新处方在上市前必须经 FDA 审批。在审批上市中, FDA 必须确保药品安全而且对标识的适应证是有效的。为确保药品符合鉴定、含量、品质和纯度的所有标准, FDA 要求进行生物利用度/药代动力学研究,其中所有药品都需要进行生物等效性研究。

对未经批准的全新药物,其体内生物利用度试验必须采用准备上市的处方,必须提供药物活性成分或治疗成分基本的药代动力学参数,包括单剂量和多剂量给药后的吸收速度和程度、消除半衰期、消除和代谢速率。这些体内生物利用度研究数据对确定给药剂量和药物标签很重要。

体内生物利用度研究也适用于已被 FDA 批准上市的药物活性成分或治疗成分的新处方。目的是测定生物利用度和描述新处方、剂型或新盐及酯的药动学性质。获得药物活性成分或治疗成分的生物利用度和药代动力学参数数据后,相对于参比制剂才能确定给药剂量。

生物等效性药品是指在相同的试验条件下,单剂量或多剂量服用相同药物生物利用度(即药物吸收的速度和程度)无明显差异的相同制剂。

一些相同的制剂可能在药物吸收程度上相等但在吸收速率上不相等,也被认为是生物等效的,因为这种吸收速率不等是有意的,而且要标识,临床使用对于达到有效药物浓度不是必需的,或者被认为对治疗是不重要的。

通用名药品指与参比的、上市的专利药相比含有相同

治疗活性成分的化学形式,其剂型相同、给药途径及剂量相同、试验环境相同,且两者生物利用度无明显差异。药剂学等效物某些性质可以不相同,如外形、释放机制、包装和辅料(包括颜色、矫味剂、防腐剂)。

治疗等效的药物是指在标签注明的条件下患者服用产生相同临床疗效和安全效用的药剂学等效物。治疗等效的药物遵循如下标准:①产品安全有效;②产品是药剂学等效的,含有相同的治疗活性成分,剂型和给药量相同,符合剂量、质量、纯度和鉴别等方面的标准,符合体外试验的标准;③产品生物等效,没有潜在的问题,符合生物等效的标准;④产品有明确标识;⑤产品生产过程符合 GMP 标准。

通用名药品需要 FDA 简化新药申请(ANDA)的批准,在参比药物专利到期后才能上市销售。通用名药品必须与参比药物治疗等效,但某些性质可以不相同,如外形、标示和辅料(包括颜色、矫味剂、防腐剂、有效期和标签其他次要方面)。

药剂学可替换物指含有相同治疗部分但属于不同的盐、酯或复合物(如四环素盐酸盐与四环素磷酸盐)或不同剂型(如片剂与胶囊;速释剂型与控释剂型)或剂量。

总之,临床研究测定药品的安全性和有效性是有效的。生物利用度研究用于阐明药物理化性质和剂型的改变对药动学性质的影响;然而,生物等效性研究用来比较同一药物(同样的盐或酯)的不同产品。如果药品是生物等效和治疗等效的,那么它们的临床疗效和安全范围被认为是相似的,可以互相换用。

药物体外测试结果预示体内的生物利用度

衡量一个药品性能的最佳方法是把它给志愿者或患者使用,然后利用药代动力学或临床研究的方法测定体内的生物利用度。一些性质明确的药物和某些生物利用度已知的药品(如注射用水溶液),体内生物利用度研究是非必须的,对这些情况,药物性能的体外研究可作为替代预测体内的生物利用度。因为这些药品通过体外药物和药品性质来预测体内性能是可行的, FDA 认为在以下情况体内生物利用度试验是非必需的(表 8)。

表 8 可免除生物利用度测试的制剂实例

条 件	实例	备注
生物利用度不言自明的制剂	药物溶液(如静脉注射、眼用、口服溶液)	真溶液的生物利用度是不言自明的。但是高黏性溶液可能有生物利用度的问题
体内-体外相关性(IVIVC)	控制释放制剂	药物体外释放与体内生物利用度必须具有良好相关性
生物药剂学分类系统(BCS)	速释固体口服制剂	药物必须溶解度高,透膜性好并且能迅速释放
免做生物利用度	含有较低剂量的制剂	与高剂量制剂剂型一样,但剂量较低,活性成分与辅料比例一样

1. 生物利用度不言自明的药品

药品的真溶液生物利用度通常被认为是显而易见的。因而,灭菌水溶液、注射用冻干粉、眼用溶液不需要进行生物等效性测试,但是生产仍必须遵循 GMP 标准。然而,高黏溶液因为药物扩散慢可能存在生物利用度的问题。

2. 体外-体内相关性 (IVIVC)

如果选择了恰当的固体口服药物溶出方法,前期资料阐明的溶出方法优化了药物从制剂中的吸收,体外溶出度试验数据可以用来预测一个剂型的效果。整体而言,吸收好的药物 IVIVC 良好,溶出是它们吸收的限速步骤。一些吸收差的药物溶出不能预测吸收^[1]。IVIVC 研究的目的是以溶出速率作为区分指标(如处方改变敏感性和生产过程的变化的敏感性)和确定溶出标准的辅助手段。恰当运用 IVIVC 测试可以简化药品评价,包括处方、设备、流程、生产地点和批次的变化(参见 SUPAC 章节)^[2,3,10]。

FDA 认为 IVIVC 分为三级。A 级通常采用反卷积法比较药物吸收的分数和溶出的分数。这个等级的药物具有最好的相关性和生物利用度可预见性。A 级相关性通常是线性的,代表了体外溶出速率和体内吸收速率点对点的关系。A 级相关性可以通过体外溶出的数据预测体内的全过程。B 级相关性利用了统计矩分析的原理,Shargel 和 Yu 于 1985 年、1993 年和 1999 年探讨了不同溶出的 IVIVC 方法,对体外平均溶出时间与体内平均滞留或溶出时间进行了比较。和 A 级相关性一样,B 级使用了所有的体内和体外数据,但不是点对点相关性,不能反应实际的体内血浆水平曲线,因为一些不同的体内血浆药时曲线具有相同的平均滞留时间。C 级相关性是最低的,仅建立溶出参数(如 50% 溶出时间,或两小时溶出百分率等)和药动学参数(如 AUC、 C_{max} 、 T_{max})之间的单点联系。C 级相关性不能通过溶出曲线完全反映血浆药-时曲线。

生物药剂学分类系统 (BCS)

FDA 可能不要求一些速释固体口服药物进行生物利用度或生物等效性试验,因为这样的药物能满足一些特定的标准如渗透性、溶解度和溶出性质。这些性质包括药物在体外试验多个介质中的溶出,药物渗透性数据和假设药品分类在胃肠道的溶出和吸收均较理想。为了便于管理,根据药物溶解性、渗透性和溶出性质建立 BCS 体系(《FDA 行业指导草案》,1999 年 1 月,见 FDA 官方网站)。基于药物溶解度和渗透性,Amidon 等于 1995 年推荐了如下 BCS 分类系统(表 9)。

表 9 生物药剂学分类系统 (BCS)

条 件	备 注
溶解度	pH 1~8 范围内,原料药最高剂量能溶于 250mL 或更少量的水,则认为是高度水溶性的
溶出性能	运用 USP 溶出仪 I 100r/min (或 II 50r/min) 30min 内 900mL 介质中溶出量不少于标示量 85% 的制剂被认为是快速释放的
透膜性	在大量平衡测试中吸收量大于给药量 90% 的药物被认为是高度透膜性的

这个分类系统可以作为建立体外溶出条件的标准,或提供预测在 IVIVC 成功可能性的基础。药物溶解度通过将最高单剂量溶解于 250mL pH 为 1.0~8.0 的缓冲液中测定。如果一个药物单剂量溶解体积不超过 250mL,则认为其具有高度溶解性。高渗透性的药物通常指吸收超过 90% 的药物。

1. 溶解度

BCS 分类方法的目的之一是测定药物在一定生理条件下的平衡溶解度。为此,测定 pH-溶解度关系曲线时,pH 推荐范围为 1~8。应该测定 8 个或更多的 pH 水平。不能使用与药物发生化学反应的缓冲液,可以使用酸碱滴定法测定药物溶解度。通过计算溶解预期剂量所需的溶剂体积确定溶解性等级。当最高预期剂量能在 250mL pH 为 1~8 或更小体积的介质中溶解时,药物是高度溶解性的。250mL 这个体积源自于典型生物等效性试验方案,自愿者服用药物时,同时服用一杯 8oz (1oz=28.349 523g,下同)水。

受试药物在选定的缓冲液中(或 pH 条件下)的稳定性应该经过稳定性试验。在免做生物等效性试验申请中一并提交 pH-溶解度、pH-稳定性数据和电离性质如 pK_a 。

2. 渗透性级别测定

人体吸收程度研究或肠道渗透性研究可用来测定药物的渗透性级别。高渗透性的药物在人体吸收程度超过 90%。药物渗透性数据也可以来自物理化学性质(如醇-水分配系数)。

测定药物在胃肠道的吸收方法包括:①人体小肠灌注;②动物肠灌注;③利用离体的人或动物器官进行的渗透试验;④人单层结肠细胞渗透试验。运用这些方法时,试验数据应该与已知的人体吸收程度联系起来。

3. 溶出

溶出等级应建立在速释药物在特定检测条件下的体外溶出率基础上,目的是说明药物在平均胃排空时间内快速溶出。速释药物在 30min 内溶出药物量的 85%,采用 USP 指定的仪器在 I, 100r/min 或者 II, 50r/min, 900mL 或更少的如下介质中进行测试:①酸性介质如 0.1mol/L HCl 或

S

USP 所指定的无酶人工胃液；②pH 为 4.5 的缓冲液；③pH 为 6.8 缓冲液或 USP 指定的无酶人工肠液。

免除生物等效性试验

除了常规的质量控制测试，相对溶出测试用来代替同样进行低剂量药物的生物利用度测试。剂量较低的药物必须与剂量高的药物成比例或质量上一致，而且释放机制相同。免做生物等效的药物必须作溶出曲线，并采用 FDA 指导原则《溶出曲线比较》第 V 节的方法评价。免做生物等效性的情况通常适用于各种规格的药物，其中一个规格的生物等效性已经批准，并参照如下标准：①具有线性动力学特征；②采用最高剂量进行生物等效性试验；③在充分的溶出试验和提供低剂量在处方上与高剂量相似的数据的基础上，低剂量免做生物等效性试验。

工艺放大和产品批准后的变更 (SUPAC)

FDA 批准一种药品上市后，生产商可能要求在生产上做一些改动。制药工业、研究机构和 FDA 制定了^[2, 3, 5, 10, 12-17]一系列行业指导原则来规范工艺放大和审批后的变更，称为 SUPAC 指南。FDA 的 SUPAC 指导原则适用于生产商提出的如下变更：①一种药物组成和成分；②批量大小；③生产地点；④生产过程或器械；⑤外包装。这些指导原则根据这些变更是否影响药品的质量和品质，描述了各种不同等级的审批后的变更。FDA 根据药品变更影响药品品质的可能性来划分变更的等级（表 10）。

表 10 审批后变更等级

变更等级	实 例	备 注
第一级	删去或部分删去影响制剂颜色和味道的辅料	一级变更不太可能对制剂量和疗效产生可检测的影响
第二级	辅料量的变化，高于第一级	二级变更对制剂质量和疗效能产生显著影响
第三级	辅料量的变化	三级变更对制剂质量和疗效能产生显著影响，可能需要生物等效性测试

参 考 文 献

- Shargel, L.; Yu, A. B. C. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics; McGraw-Hill Medical Publishing; 1999.
- SUPAC-MR; Modified Release Solid Oral Dosage Forms; Scale-Up and Post-Approval Changes; Chemistry, Manufacturing and Controls, In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation, FDA, Guidance for Industry, Sept. 1997.
- Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Containing Certain Active Moieties/Active Ingredients Based on a Biopharmaceutics Classification System, FDA Draft Guidance for Industry, Jan. 1999.
- Skelly, J. P.; Shah, V. P.; Konecny, J. J.; Everett, R. L.; McCullouen, B.; Noorizadeh, A. C. Report of the Workshop on CR Dosage Forms: Issues and Controversies. Pharmaceutical Research 1987, 4 (1), 75-78.
- Shah, V. P.; Konecny, J. J.; Everett, R. L.; McCullouen, B.; Noorizadeh, A. C.; Shah, V. P. In Vitro Dissolution Profile of Water Insoluble Drug Dosage Forms in the Presence of Surfactants. Pharmaceutical Research 1989, 6, 612-618.
- Moore, J. W.; Flanner, H. H. Mathematical Comparison of Dissolution Profiles. Pharmaceutical Technology 1996, 20 (6), 64-74.
- Hendeles, L.; Weinberger, M.; Milavetz, G.; Hill, M.; Vaughan, L. Food Induced Dumping from "Once-A-Day" Theophylline Product as Cause of Theophylline Toxicity. Chest 1985, 87, 758-785.
- Allen, P. V.; Rahn, P. D.; Sarapu, A. C.; Vandewielen, A. J. Physical Characteristics of Erythromycin Anhydrate and Dihydrate Crystalline Solids. J. Pharm. Sci. 1978, 67, 1087-1093.
- Aguiar, A. J.; Krc, J.; Kinkel, A. W.; Samyn, J. C. Effect of Polymorphism on the Absorption of Chloramphenicol from Chloramphenicol Palmitate. J. Pharm. Sci. 1967, 56, 847-853.
- SUPAC-IR Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Scale-up and Post-Approval Changes; Chemistry, Manufacturing and Controls, In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation, FDA Guidance for Industry, Nov. 1995.
- FDA Regulatory Guidances FDA Website for Regulatory Guidances. www.fda.gov/cder/guidance/index.htm .
- Amidon, G. L.; Lennernas, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R. A Theoretical Basis For a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability. Pharmaceutical Research 1995, 12, 413-420.
- Skelly, J. P.; Amidon, G. L.; Barr, W. H.; Benet, L. Z.; Carter, J. E.; Robinson, J. R.; Shah, V. P.; Yacobi, A. In Vitro and In Vivo Testing and Correlation for Oral Controlled/Modified-Release Dosage Forms. Pharmaceutical Research 1990, 7, 975-982.
- In Vitro-In Vivo Correlation for Extended Release Oral Dosage Forms, Pharmacopeial Forum Stimuli Article, United States Pharmacopeial Convention, Inc.; July 1988; 4160-4161.

15. In Vitro In Vivo Evaluation of Dosage Forms, U. S. P XXIV (1088) United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2051—2056.
16. Shah, V. P.; Skelly, J. P.; Barr, W. H.; Malinowski, H.; Amidon, G. H. Scale-up of Controlled Release Products—Preliminary Considerations. *Pharmaceutical Technology* 1992, 16 (5), 35—40.
17. Skelly, J. P. Report of Workshop on In Vitro and In Vivo Testing and Correlation for Oral Controlled/Modified-Release Dosage Forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1990, 79 (9), 849—854.
18. Cadwallader, D. E. *Biopharmaceutics and Drug Interactions*; Raven Press; New York, 1983.
19. Gibaldi, M. *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*; Lea & Febiger; Philadelphia, 1984.
20. Gibaldi, M.; Perrier, D. *Pharmacokinetics*; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1982.
21. McGinity, J. W.; Stavchansky, S. A.; Martin, A. Bioavailability in Tablet Technology. *Pharmaceutical Dosage Forms; Tablets*; Lieberman, H. A., Lachman, L., Eds.; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1981; 2.
22. Rowland, M.; Tozer, T. N. *Clinical Pharmacokinetics. Concepts and Applications*; Lea & Febiger; Philadelphia, 1995.

(丁存刚 译)



S

湿热灭菌法

Dario Pistolessi

Fedegari Autoclavi S. p. A., Albuzzano, PV, Italy

引言

对某种物质进行灭菌意味着使它变成“无菌的”[该词是在希腊语含有腐败意思的词语 sepsis (败血症) 前面加上一个否定前缀“a”衍变而来的]。换句话说,它意味着灭活能产生腐败作用的微生物(从广义上说)。

湿热灭菌法就是根据微生物灭活的水平在一定温度下引入或产生(甚至是间接的)水蒸气(或更一般地说是湿热,即适宜的温度和湿度组合),并在该条件维持一定时间。在后面的阐述中可以看到,湿热灭菌法以反对数级数的方式进行。因此,只有无限长时间的持续湿热灭菌,才能确保所有微生物都已失去活性。

在制药工艺方面,定义一个物品无菌,就要能够证明在与操作条件有关的统计学基础上,不超过百万分之一的灭菌物品“可能”是非无菌的。因此,产品的无菌保证水平(SAL)必须大于(或等于) 10^6 。显然,这种情况的结果是有概率涵义的。尽管无菌这个词语所表达的是一个绝对概念,但“已灭菌”可以理解为充分灭菌过程的结果。

目前与灭菌有关的药典、标准和指南中通常使用以下语句:

“……灭菌是一个特殊的过程,因为其功效不能通过对终产品的简单检查和测试进行验证……。因此,灭菌过程必须进行使用前的验证,灭菌过程常规监控以及设备定期维护……”

据此,灭菌器的安装确认、操作确认、工艺验证以及每个常规过程的连续监控现在被认为是最基本的^[1]。因此,无菌测试(也就是最终产品的微生物测试)已失去了很多以前拥有的那种重要性^[2],但是它们仍然在实行。事实上,所谓的参数放行(也就是基于每个过程紧密控制的物理参数评价的放行,不进行无菌测试)理论上为多数药典所接受,但是(例如,欧洲药典所述的)得“……服从于主管当局的批准……”,而这种批准通常很难获得。

所有药典都把湿热灭菌法作为优选的方法,即该方法的首选,除非需灭菌的产品与蒸汽特性不相容。优先选择的原因是湿热灭菌法综合了灵活性、可靠性、设备成本和运行费用低等优点。

概况

湿热灭菌通过在微生物灭活水平下引入(或间接产生)适宜组合的温度和湿度来实现。达到该条件的一般途径是在 121℃ (250 ℉) 时的加压饱和蒸汽。然而,其他一些灭

菌介质(如过热水或蒸汽-空气混合物)也常被采用,以避免使用纯蒸汽灭菌产生的特定问题。有时将负载物在灭菌器腔体内旋转以达到特殊的结果。

湿热灭菌动力学^[3]

假设有一个被单个微生物种属污染的系统(即安瓿里含有一种特定微生物的水性混悬液)在恒温下浸入加压的饱和蒸汽中,人们可以通过实验证明微生物的热灭活反应遵从一级化学反应(即化学降解反应),反应速率总是正比于要降解的产品量。该比例系数与特定微生物的种属和所处环境有关。这对于干热灭菌法是明显的,但是对于蒸汽灭菌法却不明显,因为水蒸气分子要参加反应。实际上,该双分子反应也是一种一级反应,因为水蒸气是过量的,其浓度可看作是常数。

最常用的数学公式是

$$N = N_0 10^{-t/D} \quad (1)$$

式中: N_0 为微生物的初始量; t 为时间(或灭菌时间); N 为灭菌后残存的微生物量; D 为“十进制衰变时间”,定义为在一个指定的恒定温度下,微生物总量减少到 1/10 所需的时间间隔。

在 121℃,对在制药工业中遇到的各种不同种属的微生物而言, D 值通常在 0.2~1.5min 之间波动。从式(1)可以得出两个重要结论:

(1) 减少微生物总数到任何预设值的必需时间是起始浓度的一个函数;

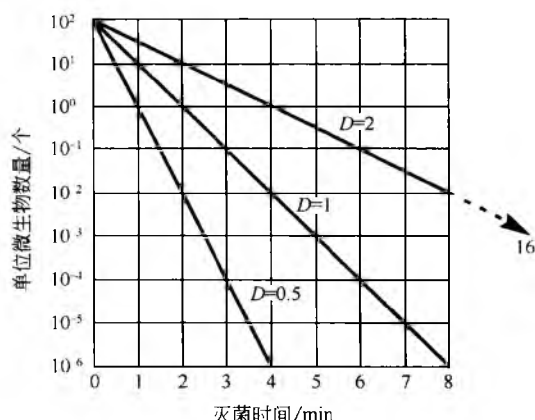
(2) 相同条件(T 和 t) 下的灭菌效果根据污染微生物 D 值的不同而不同。

图 1 显示了对于不同微生物种属(在相同的恒定温度下)在与每个种属 D 值成比例的暴露时间下是可以达到相同灭菌率的。

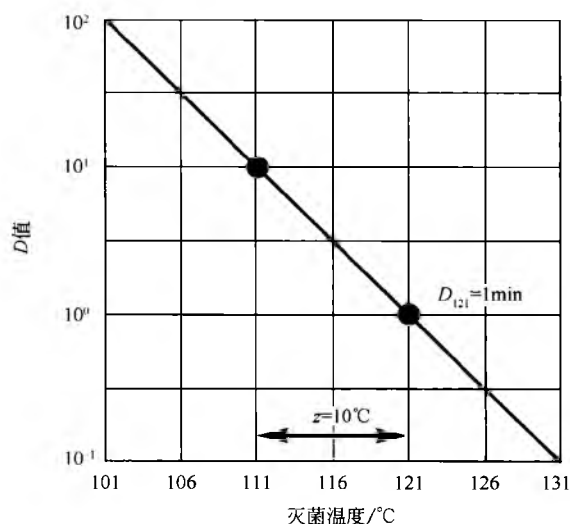
假定有一批每单位具有 100 个微生物的恒定初始数目的产品(如一批针剂)。如果 $D_{121} = 1$,则在 121℃ 下处理 1min 后,总数将减少到 $10^1 = 10$,再过 1min 后,只有 $10^0 = 1$ 个微生物将仍然存活。再过 1min,每单位存活的微生物只有 $10^{-1} = 1/10$ 。生物术语中,这样的“污染”显然是毫无意义的;从统计学上讲,它意味着有 1/10 单位的灭菌批样品可能仍受到污染。显而易见,再灭菌 5min,这种概率将减少到 1/10⁶ 或 10⁻⁶。换句话说,SAL 是 10⁻⁶。

一个比较安心的 SAL,如 10⁻⁹,是我们所追求的。达到这一标准延长灭菌 3min 就足够了。因此,该问题明显与费用无关,而是因为处理的样品有发生热降解的风险。

所有上述的考虑都是在假设灭菌周期内温度保持恒定


 图1 致死率曲线^[3]

的前提下进行的。很明显，当温度改变时， D 值也改变。由实验获得的给定微生物种属的 D 值对温度 T 在半对数图上作图，如图 2 所示。


 图2 温度增加时 D 值的对数值呈线性下降^[3]

很明显，如果在 121°C 时 $D=1.0$ ，在 131°C 时则为 0.1 ，在 111°C 时为 10 。换句话说，当温度增加或减少 10°C 时， D 值将减少或增加 10 倍。 Z 值定义为湿热灭菌法的温度系数，也就是导致 D 值或灭菌速率以 10 倍变化的温度度数。根据灭菌的微生物，在 $100\sim 130^{\circ}\text{C}$ 的灭菌范围， Z 值在 $5\sim 15$ 之间变化。在缺乏准确实验数据的前提下，通常假定 Z 值为 $10^{\text{[1]}}$ 。

可见，温度的微小变化将引起灭菌反应速率的巨大变化。很容易计算，温度在 121°C 附近仅变化 1°C ，将引起 D 值变化约 24% ，即灭菌速率变化约 24% 。

F_0 或等价时间

为了比较任何时间 t_x ，任何温度 T_x （可能随 t_x 改变而改变）下灭菌的杀菌效果，可通过计算建立与参比温度的关系来表示这些杀菌效果。当参比温度是 121°C （或者更精确地说，是 121.11°C ，对应于 250°F ），并假定 Z 值为 10 （如果温度以 $^{\circ}\text{F}$ 表示，则为 18 ）时， F_0 可用下式表示：

$$F_0 = \Delta t \sum 10^{\left(\frac{T-121}{Z}\right)} \quad (2)$$

式中： Δt 为连续两次温度测定的时间间隔； T 为在时间 t 时实际的灭菌温度（ $^{\circ}\text{C}$ ）； Z 为温度系数，假设为 10 。

F_0 实际上是以分钟为单位的等价时间。很明显，式 (2) 中当 $\Delta t=15\text{min}$ 、 $T=131^{\circ}\text{C}$ 时， $F_0=150\text{min}$ ，即杀菌效果是在 121°C 下灭菌 15min 时的 10 倍。如果 $\Delta t=15\text{min}$ ，而 $T=111^{\circ}\text{C}$ ，则 $F_0=1.5\text{min}$ ，即杀菌效果是在 121°C 下灭菌 15min 时的 $1/10$ 。当 $F_0=12$ （传递到负载物的最冷点）时，在制药领域中通常认为可充分灭菌^[4]。

湿热灭菌过程

目前在药物生产中广泛应用的三个湿热灭菌过程为：①加压饱和蒸汽；②过热水；③蒸汽-空气混合物。过程①是传统的多用途过程，其使用加压的纯饱和蒸汽作为灭菌介质。过程②和③是所谓的反压力过程，大约在 20 年前引入药品生产，分别采用喷射过热水和均一的蒸汽-空气混合物作为灭菌介质。这些过程对灭菌介质的压力进行控制，却不依赖温度（使用纯饱和蒸汽是不可能达到的）。当容器不能耐受过程①灭菌时内部产生的超压力时，则可利用这些过程来处理这些容器内的溶液。

加压饱和蒸汽法

加压饱和蒸汽法是应用最广泛和最通用的湿热灭菌法。因此，不仅广泛应用于药剂产品的灭菌，而且应用于实验室和医院的灭菌以及医疗器械的处理。然而，它的应用也受到很大限制，特别是下面讨论的药用途径。灭菌介质显然是加压纯饱和蒸汽。饱和的意思是在特定温度下蒸汽与其液体形式（水）之间处于热力学平衡。

典型的操作条件是在 121°C （即 250°F ）维持 15min （或较短的时间）；该温度与 $2.05\text{abs bar}^{\text{①}}$ （即 205kPa ）的饱和蒸汽压相匹配。然而，通常使用较高或较低的温度（因而压力也有变化），维持时间也需要适当调整。

有时也使用干饱和蒸汽的术语。应该清楚干燥是蒸汽的理论条件，而实际上用的是湿饱和蒸汽，这也保证了蒸汽是真正饱和的而没有过热。实际上使用过热蒸汽可能会

① 非法定单位。

引发过程管理的许多问题。

然而,应尽可能让蒸汽不产生冷凝液。蒸汽干燥分数定义为湿蒸汽产生的冷凝液量。0.95 的干燥分数是指 100g 的湿蒸汽中含有 95g 干燥的饱和蒸汽加上 5g 的冷凝液。冷凝液当然应与蒸汽在相同温度下。0.95 的干燥分数认为是湿热灭菌法充分灭菌的下限。

饱和蒸汽灭菌的可靠性基于该介质的三个基本特点:

(1) 当蒸汽冷凝时,在恒定的温度下释放大量的热量;1kg 的蒸汽在 121℃ 时冷凝(转换成 121℃ 的水)可释放大达 2200kJ 的热量。

(2) 饱和蒸汽的温度和压力具有双向关联。一旦确定了蒸汽温度,也就确定了压力,反之亦然。121℃ 的饱和蒸汽压力必定为 2.05abs bar; 3.04abs bar 饱和蒸汽温度必定为 134℃。这使两个很有趣的实用操作成为可能:一个纯饱和蒸汽高压灭菌器能够以温度或压力进行同等控制,而不考虑用于控制的参数,第二个参数很容易反过来监控第一个参数。

(3) 1mol 的水(18g,即 18mL 的液态水)在 121℃、2.05abs bar 时蒸汽所占的体积约为 15L。这意味着当蒸汽在 121℃ 时冷凝,它的体积将收缩近 1000 倍。因此,膨胀的蒸汽自动与需灭菌的材料接触。形成的冷凝物很容易通过冷凝阱或者连续流出的方式从高压灭菌器腔室中去除。

除了以上三个有利特点外,还必须考虑其他与使用纯饱和蒸汽有关的现象:

(1) 为了达到蒸汽的灭菌作用,蒸汽必须与细菌接触(直接接触或间接接触)。例如,当蒸汽与高压灭菌器室中的外科器械接触时,即为直接接触;当一个装有水溶液的密封安瓿内产生的蒸汽与腔体中的蒸汽进行热交换时即为间接接触。然而,如果安瓿是空的或内容物是无水的油溶液,那么很明显采用蒸汽灭菌是不可能的。

(2) 腔体中的初始空气和蒸汽中可能夹带的不凝气体(一般是 CO_2),也有分子质量,其密度比蒸汽高 1.5~2.0 倍。因此,在过程开始阶段,必须将空气从腔体中排除,同时蒸汽中不能含有不凝气体。否则,它们倾向于在腔体内低处分层,产生无法接受的温度梯度。

(3) 当对盛有水溶液的密封不变形容器进行灭菌时,容器内压力会远远高于腔体内压力,其原因在后文中会详细解释。内部超压达到或超过 1.4bar,这对于许多容器来说都是无法承受的。在这些情况下,使用抗压力高压灭菌器是必要的,而且很方便(将在后面叙述)。

饱和蒸汽高压灭菌器

1. 构造

目前所有药用灭菌器都采用 AISI 316 不锈钢制造,包括阀门和管道,其他材料仅用于灭菌器下游的辅助装置(如真空泵或冷凝阱)。灭菌器上游的辅助装置(如热交换器或水泵)也必须由不锈钢制造。

硅酮橡胶或 PTFE(聚四氟乙烯)及其衍生物通常用于制作密封垫圈(门、阀门等)。高压灭菌器的腔体是水平的,带有矩形截面或(几乎没有)圆柱形截面,这些腔体的大小变化较大,可从约 100L 到 10m³ 或更大。

2. 门

灭菌器的门通常是矩形的,即使腔体是圆柱形的。在这种情况下,门与圆周形成内切。可能有一个或两个门,当高压灭菌器通向无菌室时通常需要两个门。当不是用于通向无菌室时,双门高压灭菌器也是常用的,但这被认为是用来分隔装载区(放置未消毒产品)和卸载区(只放置已消毒产品)。这些门可能有不同种类。

2.1 径向连轴杆连接的侧铰链手动门

这是目前应用最广泛的门,边缘垫圈是实心且固定的。在开关门时通过手动的中心操纵手轮移动辐条。该门锁系统需要润滑油,但会引起微生物污染问题,尤其当此门通向无菌室时更是如此(使用周吊环螺栓的关闭方法现已被取消)。

2.2 垂直或水平滑动的自动门

这种门没有润滑剂问题,但水平滑动门(常用于工业高压灭菌器)存在缺点,即占据相当大的地面空间。垫圈通常位于腔体的榫接处且有两种方法将其压于门上:①垫圈是空心且可膨胀的(通过压缩空气或蒸汽);②垫圈有一个特殊的楔形榫头横截面,且包裹于也具有楔形榫头横截面的狭槽中。狭槽后部压缩空气的足够压力足以使门上的密封圈发挥作用,且压力的释放(不需要真空泵)也足以让密封垫圈缩回(图 3)。

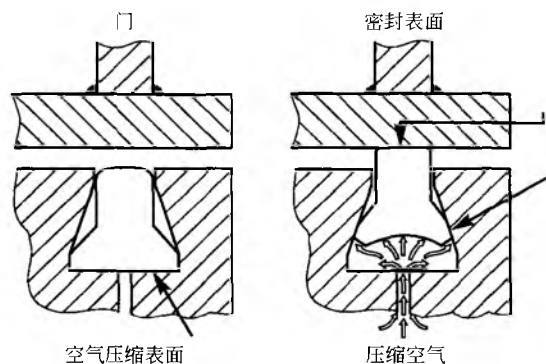


图 3 压缩空气挤压的楔形榫头垫圈部分^[5]

2.3 对角移动门

这种门结合了前两种门的优点。当打开时门轻微向上侧部自动移动(关闭时相反),足以脱离固定其四侧的机械系统。随后,操作者通过反向旋转门的侧铰链手动推开门。密封垫圈通常与上述第二种类型相同。

3. 夹套

饱和蒸汽高压灭菌器一般有夹套,该夹套由两层壁组成,完全围住内腔体,从而形成环绕的次级空间。为简明起见,这里不再叙述不同夹套的构造方法。安装夹套的目的归纳如下:①预热最初的高压灭菌器并在装载和卸载过程中保温;②在最初的空气除去阶段预热装载物;③在最后真空阶段帮助烘干装载物;④减少蒸汽产生的冷凝液。

蒸汽可以通过以下方式输入夹套:①单次输入,即蒸汽首先进入套中,在内部循环再流出来,随后进入腔体。只有单次填充方法可以减少蒸汽产生的冷凝液;②分离式填充,当然在该法中需要有两个控制器。夹套由工厂蒸汽输入而腔体内必须输入超洁净蒸汽。目前,这是现代高压灭菌器常用的解决办法,因为这确保没有微生物或颗粒污染物从夹套到达腔体。夹套是一个封闭旋绕的空间,不可能精确地清洁与检查。

4. 过程

4.1 腔体内最初空气的除去

除去空气的基本原因在前面已有叙述。此外,负载物多为多孔或包装好的材料,需要快速可靠地除去负载物内部的空气。

当今,所谓的重力移动法仅用于特殊的灭菌任务。在该方法中,蒸汽进入腔体顶部并由适当的喷淋器均匀分散(理论上均匀分布)。由腔体底部的大阀门通过两种作用方式完成放气:重力和蒸汽置换。该法相当慢且不适用于多孔和其他能将空气陷入内凹孔穴中的填充物。

现代高压灭菌器一般配备水泵,可以在腔体内形成真空,但残留将近70mbar的压力。因此,几乎7%的空气不能除去。下面是两种用于除去空气的主要方法:

(1) 脉冲式真空:一旦达到最大起始真空度,泵便停止工作,蒸汽进入腔体内直至接近大气压(或更高)。然后再次抽真空。三次真空/压力脉冲一般足以除去空气。

(2) 动态式真空:一旦达到最大起始真空度,泵持续运行5~10min,从位于真空排出点对面的腔室的另一侧开始注入蒸汽。

根据需灭菌的装载物,现代高压灭菌器可以采用这两种方式。

4.2 加热和灭菌阶段

在加热和灭菌阶段,室内有大量冷凝物形成。这些冷凝物必须除去,有两种主要途径可以达到这一目的。第一种为采用腔体底部的冷凝阱,这是最廉价且简便的方法,但由于阱的惯性,当阱开放时会引起压力的大幅度下降(也会使温度下降)。第二种为采用动态蒸汽,这是最可靠的方法,但比较贵。在加热和灭菌阶段,真空泵连续运行,通过一个小阀门抽出冷凝物。同时伴随少量蒸汽的持续排出,因而产生了蒸汽的动态状况。

4.3 后灭菌阶段

与灭菌材料和所需结果密切相关。最普通的解决方法如下:

(1) 烘干-冷却最终真空:通过重启真空泵直至到达预先设定的真空度(如100mbar),然后让泵按预先设定的时间持续运行。多孔物质(和无孔物质)得以迅速烘干并冷却。

(2) 套中冷水循环冷却:该法适用于充有部分溶液(如培养基质)且不密闭的容器。烘干-冷却最终真空法不适用于这种容器,因为溶液将会沸腾,且通过直接喷洒冷却(在后面将会讨论)会带来污染。在与灭菌压力相当或更高的压力下,引入无菌空气从腔体移除蒸汽。随后套中冷水进行循环冷却。增加室中空气压力的两个目的:预防溶液沸腾和改善装载物与套内冷水的热交换。

(3) 直接喷洒冷水于装载物表面进行冷却:该法一般用于冷却放于多孔盘中、排列规则、充满且密封的安瓿。通过装于腔体顶部的喷雾器喷洒(或喷雾)纯净水或注射用水于装载物上。水的雾化过程加速了蒸汽冷凝,同样也加速了室内压力的下降,但安瓿内的压力仍然保持很高(因为溶液温度下降较慢)。高质量的安瓿足以承受这样的处理。一般当装载物的温度达70~80℃时,停止水喷雾。因此,装载物一旦离开高压灭菌器,仍然有足够高的热能使其自然干燥。

(4) 采用空气反压力使冷水直接喷洒于装载物表面进行冷却:直接喷洒冷水于装载物表面冷却的方法产生的压迫应力,通常不能为装载物所承受。对于这种情况的解决办法是,在与灭菌压力相当或更高的压力下用无菌空气置换腔体中的蒸汽。待这种置换操作完成后,才将冷却水喷洒于装载物上。然而很明显,这种方法只考虑到在冷却阶段容器压迫应力的减少,但在灭菌阶段(后面将会讲述)的压迫应力是不可避免的。

(5) 安瓿坚固性试验:这种试验的目的是排除那些有密封缺陷、破裂或有裂纹的安瓿。这种试验主要归为两类:安瓿内染色液(通常使用亚甲基蓝)的渗透和后期灭菌的压迫应力。由于篇幅有限,这些方法的细节就不在这里讲述了。

4.4 进入室内空气的灭菌

如前所述,在很多情况下需要在灭菌室内引入空气。引入的空气必须是无菌的,否则会再次污染灭菌装载物或连接双重门高压灭菌器的无菌室。这些空气一般是由高压灭菌器中的过滤装置来完成灭菌的。因此必须:

(1) 提供能适当截留的过滤筒;

(2) 允许高压灭菌器的自动灭菌过程进行组装系统的原位周期性灭菌;

(3) 确保生产中使用的连续灭菌过程中过滤系统及其管道系统始终保持无菌;

(4) 在进行每次过滤系统的灭菌过程之前和之后进行

系统完整性试验;

(5) 先前提及的所有过程的验证。

4.5 过程控制器

如今, 高压灭菌器安装的过程控制器是可编程的逻辑控制器 (PLCs)、个人电脑 (PCs)、专门的电子解决方案或上述系统的不同组合。不过, 大量旧式的电动、气动系统控制的高压灭菌器仍在用。很显然, 现代的过程控制器能够提供以前不可想象的性能。如今, 温度和 (或) 压力的控制一般是通过比例-积分-导数算法来执行的。灭菌过程可以由时间控制或者由 F_0 控制 (F_0 通过数个用于此功能的可弯曲的温度传感器累积数据得到)。有些管理系统可以改变组成程序和参数设置。阴极射线管 (CRT) 或液晶显示器 (LCD) 提供的实时信息或产生/储存于纸质/电子媒介的信息都是非常详细的。

在蒸汽灭菌过程中, 部分填充水溶液且密封的硬质容器内外的压差

当前述条件下的容器在传统的采用纯净饱和蒸汽的高

压灭菌器中灭菌时, 容器中会产生与高压腔体内压力相比大得多的超压。这归因于这样一个事实, 即灌装时存在的空气 (或气体) 残留在容器内, 然而过程开始时高压腔体内的空气已排出。图 4 解释了理想条件下的这一现象 (假定空气是一种理想气体)。

试验研究表明, 真实的超压远高于理论值。这是由于: 水的热膨胀大于玻璃容器的热膨胀; 当温度上升时, 溶液中溶解的气体溢出; 空气不是理想气体。很明显, 超压依赖于灌装温度、灭菌温度、溶液体积和顶空体积的比率等, 但是在 121°C 时, 其平均值接近 1.4bar。显而易见, 不能忽视这种现象: 口径横截面积约 4cm^2 的玻璃瓶塞会受到将近 6kg 的挤压力。

因此, 这些条件限制了采用传统的纯净饱和蒸汽高压灭菌器灭菌盛放于下列容器中的溶液:

- (1) 玻璃瓶中的大体积注射剂 (LVP);
- (2) 塑料容器 (柔软的、半刚性的、硬质的) 中的大体积注射剂 (LVP) 和小体积注射剂 (SVP);
- (3) 预灌装的玻璃或塑料注射器;
- (4) 有压紧或螺旋盖的广口瓶和类似容器;
- (5) 含有不同物质的泡罩包装, 如一性的隐形眼睛。

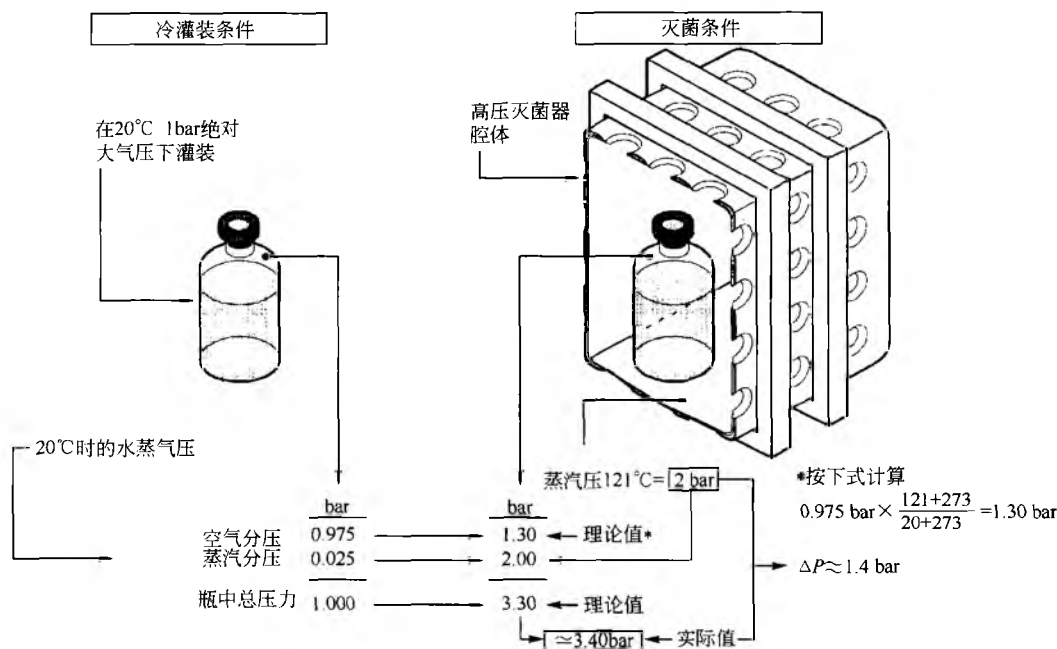


图 4 121°C 蒸汽灭菌过程中, 部分填充水溶液且密封的硬质容器内产生的压力的示意图^[5]

对上述产品进行正确灭菌, 有必要选用反压力高压灭菌器。

反压力湿热高压灭菌

反压力湿热高压灭菌器是一种不依赖于温度变化来控制灭菌介质压力的装置, 主要用于溶液的最终灭菌。

因此, 出现了不受两个参数控制的双重控制原理。目

前使用的两种方法是过热水喷雾高压灭菌法和蒸汽-空气混合物高压灭菌法。

过热水喷雾高压灭菌器

图 5 是这种灭菌器的典型示意图。装置的主要结构不变, 腔体一般为水平放置的圆柱体, 单壁, 圆周内切矩形门。

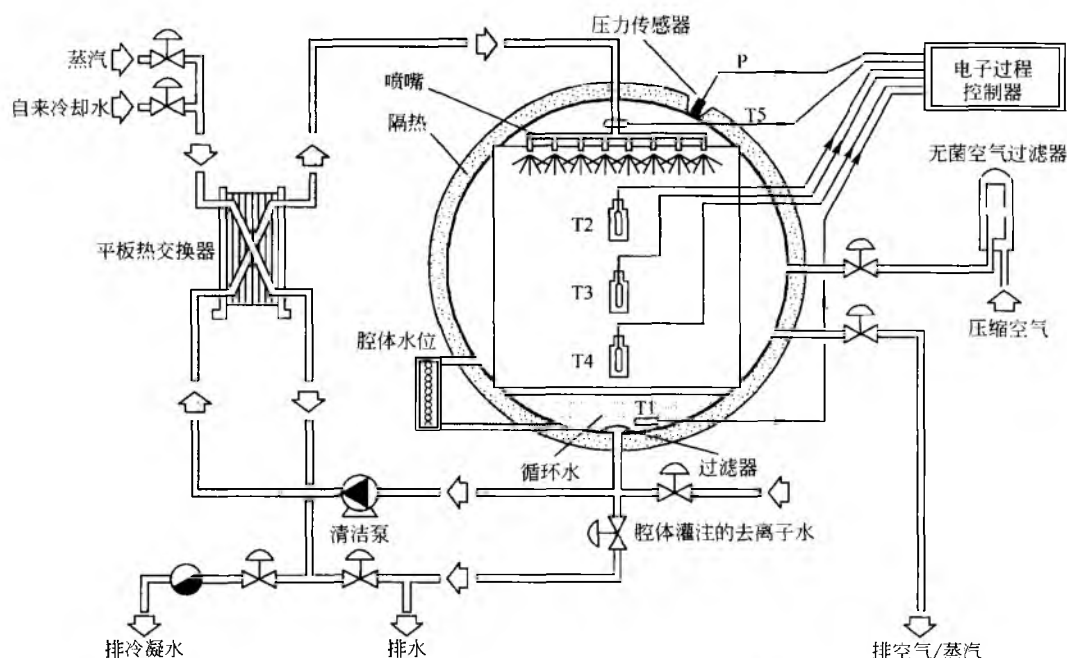


图5 过热水喷雾高压灭菌器：简化了 P. & I. D. [3]

在灭菌过程开始时，装载完产品后，腔体内较低处充有化学和细菌学上合格的水。室内的空气没有除去。清洁泵循环填充的水溶液经过热交换器（可移运平板或其他清洁类型），从而在逆流的工厂蒸汽中间接加热。随后水由装于腔体上部并配有圆锥形喷嘴的喷雾器喷洒在装载物表面。支持产品的合适的多孔支架确保了装载物下层水再分布的均衡。有时在腔体两侧还会有额外的水喷雾器喷嘴。

因此循环水和装载物的加热是逐步但非常迅速的。在500mL的容器内达到121℃一般需要25~30min，加热速率主要取决于溶液及其承载容器的特性。在灭菌阶段，温度的时间和空间均匀性通常很好，甚至优于±1℃。冷却阶段采用相同的循环水，这些循环水是无菌的，且通过热交换器连续再循环。在热交换器中冷水（替代蒸汽）流动，但不与无菌循环水接触。500mL容器内的温度下降到80℃需要10~12min。这一温度通常适用于填充物离开高压灭菌器后的迅速自发地干燥。

在过程的每一阶段腔体内均维持合适的空气分压（过滤灭菌），用以补偿容器内的超压。可以采用不同方法控制腔体总压（蒸汽+空气）。采用计算机化的过程控制器，还能在每一阶段的任何时候将空气分压与两个或更多参比容器的溶液温度平均值建立联系。

填充物不会受到热或压力的冲击，因为腔体内与容器内的压差会降低到零或在过程中始终维持某种趋势不变，这种趋势通常适用于灭菌阶段或从60℃到127℃热处理阶段的特定类型容器。

很明显，这些高压灭菌器在应用方面存在一些局限性：

(1) 采用腔体抽真空或在腔体内与装载物之间循环热空气的方法干燥装载物是不可能的或不合理的；

(2) 如果灭菌材料具有向上的凹面，那么在过程结束时凹面内将会填满水，显而易见的补救措施就是将其倒置。

(3) 当灭菌溶液灌装于PVC袋时，会出现所谓的雾浊现象，这是由于PVC能够吸收水变白。而这种雾浊现象的消失需要很长时间，该时间取决于PVC的类型及其含有的增塑剂。采用聚丙烯（PP）、聚乙烯（PE）和多层塑料就不会出现雾浊现象。

这些高压灭菌器的尺寸变化相当大（1~20m³或更大），通常配备自动化装载和卸载系统。

蒸汽-空气混合高压灭菌器

图6是这种灭菌器的典型示意图，可以选用的其他类型将在后文中介绍。其高压室与过热水喷雾高压灭菌器相似。过程开始时，蒸汽直接由位于腔体底部的喷雾器喷入室内。但不除去腔体内原有的空气。位于腔体顶部的高效风扇和变流装置发挥均匀和循环腔体内蒸汽-空气混合物的作用。这是一个重要而又艰巨的任务，因为空气明显倾向于在底部分层。室内形成的冷凝物通过连续自发的流动而除去。

冷却阶段主要是输送无菌压缩空气至腔体内来冷凝和替代腔内所有蒸汽，灭菌总压力可能维持不变也有可能升高。随后向内部热交换器注入冷水，该交换器由安装在腔体两侧扇区的一组中空板组成（为了简化，图6仅显示了一块板）。然而，这种冷却方法使用了两次固体-气体热交换，效率较低。可以尝试在产品承受的限度内增加腔体内的气压，从而提高空气密度及其交换效率。风扇在冷却阶段继续运行。

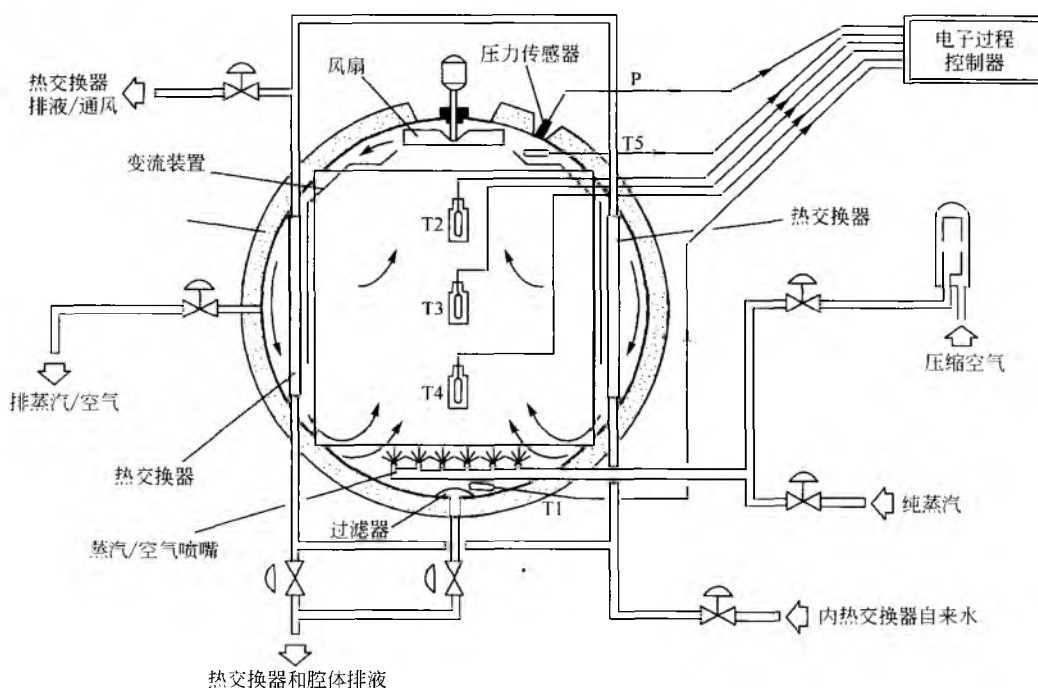


图6 蒸汽-空气混合高压灭菌器：简化了 P. & I. D. [5]

尽管采用了这种改进措施，但其冷却阶段要明显长于过热水喷雾高压灭菌器。蒸汽-空气混合高压灭菌器的机械关键点是风扇转轴的坚固性。这一问题已被更先进的采用磁力驱动风机的机器完全解决（见图7）。该过程的空气分压与前述的过热水喷雾高压灭菌器相同，尺寸和装载/卸载系统也类似。

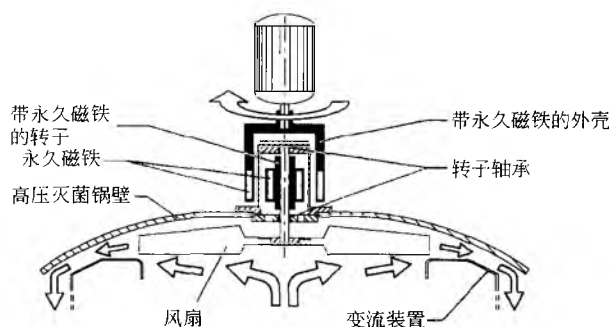


图7 磁力驱动风机的示意图[5]

图6中的结构可以改变的有：（1）位于腔体单侧的卧式风机（替代直立风机）。这一改变使转轴承受更大的弯曲和振动风险，引起精密密封系统的磨损。此外，生产水平转轴的磁力驱动风机在技术上有很大难度；（2）壳管式热交换器代替平板式热交换器。

采用蒸汽-空气混合高压灭菌器，PVC袋的“雾浊”现象一般不比过热水喷雾高压灭菌器严重，其仅影响PVC袋搁在支持架上的区域。蒸汽-空气混合高压灭菌器的优势之一是结合了传统纯饱和蒸汽循环系统的灭菌器相比，相

对简便，这种简便体现在制造混合纯蒸汽/蒸汽-空气混合高压灭菌器中（在这种情况下，腔体配备夹套和真空泵）。尽管有厂家生产这种装置，但并不推荐这种组合来代替过热水喷雾高压灭菌器。表1对过热水喷雾和蒸汽-空气混合高压灭菌器进行了概括比较。

表1 过热水喷雾（SWS）和蒸汽-空气混合（SAM）高压灭菌器的评价比较[5]

	过热水喷雾（SWS）	蒸汽-空气混合物（SAM）
温度的时间均一性	好	好
温度的空间均一性	好	好
总压力控制	好	好
反压力控制	好	好
高质量水的消耗（WFI）	中度，用于初始填充	无
冷却自来水的消耗	可接受	比SWS高约3倍
压缩空气的消耗	可接受	可接受
工业蒸汽的消耗	可接受	无
超洁净蒸汽的消耗	无	可接受
冷凝液回收	可能且容易	不可能
冷却水回收	可能，回收水开始很热	可能，回收水开始很热
高压灭菌器价格	可接受	比SWS高约10%
总过程持续时间	短	比SWS高约30%
高压灭菌器的性价比	高	比SWS低约30%

续表

操作规则 总机械设计 高压灭菌器资格/ 验证	非常简单直接 简单 一般	比 SWS 复杂 比 SWS 复杂 一般
根据装载物类型的 操作灵活性	适用于下列任何 容器： • 朝上的凹槽聚 积水 • 除湿的产品 • PVC 袋可能产 生“雾浊”效应	适用于下列任何 容器： • 朝上的凹槽仅聚 积冷凝液 • 可能稍微除湿的 某种容器 • PVC 袋的限制性 “雾浊”效应
与饱和蒸汽过程混 合的可能性	不推荐	可行，价格中等

旋转式装载灭菌

目前，医药市场上越来越多地需要旋转装载高压灭菌器。旋转装载主要有三个目的：

(1) 维持乳剂（或悬浊液）的稳定性（或均匀性），其可能会由于灭菌温度而发生破裂。

(2) 在高温下灭菌热敏感产品，显著减少了灭菌时间。值得一提的是，这一原理的推论是，湿热灭菌反应的温度

系数非常高（通常 Z 的平均值为 10），而经典热降解反应的温度系数很低（一般 Z 的平均值为 2）。很明显，要达到这个目的，产品加热/冷却灭菌速率必须很高且一致。因为旋转会搅动产品，事实上促进了热渗透进入产品以及从产品移除热的过程，尤其当产品密度大且黏稠时，这一作用更加明显。这一方法目前多应用于灭菌热敏感 LVPs，例如，葡萄糖溶液（尤其是高浓度糖溶液）或氨基酸溶液。

(3) 将快速后灭菌真空用于安瓿密封性测试。当安瓿的“开口”瑕疵在溶液水平以下时，这一试验方法（前面提到的）获得了最好的效果。无论安瓿的瑕疵位于何处（顶部、肩部或底部），旋转安瓿是进行密封性测试的理想方法。

当然，这种高压灭菌器的生产需要高度精确的设计和结构技术，因为：①装载物旋转系统使结构变得非常复杂；②旋转的装载物一般量大且沉重；③事实上，在旋转过程中，避免装载物的质量位移是不可能的；④由于卫生学原因，必须避免在装载物轴承和旋转系统使用润滑剂。

最后，很明显因为圆柱形结构的存在，真正的腔内装载能力降低了，腔室必须在圆柱形内部旋转并支持装载物在带盖的合适盘中旋转（整个系统应适当穿孔）。图 8 显示了两情况下的圆柱形结构，即空的和支架装满的情况。这些灭菌器通常是反压力灭菌器，在整个过程中装载物以可调节速率（1~10rpm）旋转，如果需要，还可以间歇或换向旋转。

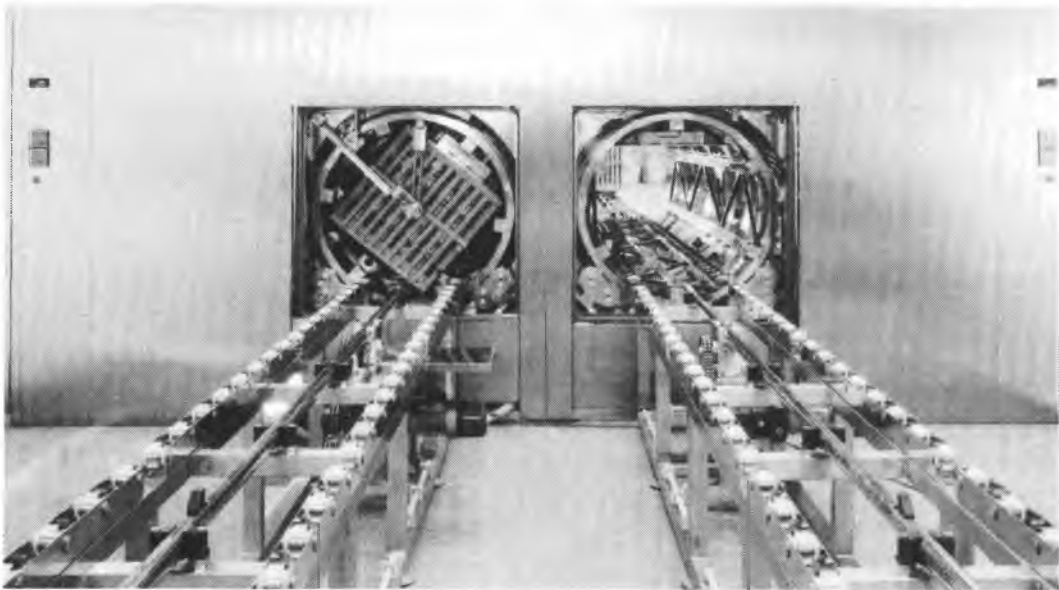



图 8 两种过热水喷雾高压灭菌器，其室容量接近 4m³，具有旋转装载物和双重滑动门。在图中未表示出过程控制器的人机接口。但图示了大型灭菌器的自动装载/卸载系统，通常用于进行快速装载和卸载操作^[5]

参考文献

1. Carleton, F. J. ; Agalloco, J. P. Validation of Aseptic
2. Lavagna, S. M. Injectables and Water for Pharmaceutical

Pharmaceutical Processes; Marcel Dekker, Inc. ; New York, 1986.

Use; Editrice Bias; Milan, 1995.

- 
3. Pflug, I. J. Syllabus for an Introductory Course in the Microbiology and Engineering of Sterilization Processes, 4th Ed.; Environmental Sterilization Service: St. Paul, MN, 1980.
 4. Validation of Steam Sterilization Cycles. Technical Monograph

No. 1 Parenteral Drug Association; Philadelphia, 1978.

5. Pistolesi, D.; Mascherpa, V. Moist and Dry Heat Sterilization Technology; Fedegari Autoclavi S. p. A.: Albuzzano PV, 1999; CD-ROM.

(闻洪亮 陈 阳 译)

世界卫生组织 (WHO) 继续全球协调对医药产品的要求

Juhana E. Idänpään-Heikkilä

Council for International Organizations of Medical Sciences,
WHO, Geneva, Switzerland



引言

世界卫生组织 (WHO) 是一个隶属于联合国的政府间的专业组织, 拥有 193 个会员国。在所有的医药产品领域, WHO 旨在全球发展、建立和提高医药产品的质量、安全性、有效性标准, 以及良好的从业法规。1998~2000 年, 作为 WHO 的直接职责, WHO 继续强有力地协调全球药品质量、安全性、有效性和命名的标准。《制剂技术百科全书》(Encyclopedia of Pharmaceutical Technology) 第一版第 18 卷对法律体系、专门技术、工作条例和规则、协商过程及 WHO 相关规范化管理机构的作用做了详细阐述^[1]。本文综述了自 1998 年来 WHO 进行的协调行动, 并介绍了新的协调提案。

1. 国际通用名

国际通用名 (INN) 用唯一的、全球通用的药物名称标识。药物活性成分有了专一的国际通用名称后, 才有药典各论、安全用药和分发指南, 才能保证全球科学家和医疗专家间能轻松地交流。INNs 可以不加限制地广泛使用 (但不能用作商标), 读音和拼写易辨别但不能太长。1998~1999 年, WHO 在其季刊——WHO 药品信息^[2]上发布了 270 种新的 INNs, 并修正了药物国际通用名使用规范^[3]。修正包括引入服务费用的概念, 改进了对提名的 INNs 提出反对意见以及替换推荐的 INNs 的程序。

给生物技术来源的药物和产品命名引起了人们越来越多的关注。为了防止 INN 被用作商品名称, WHO 努力加强与世界知识产权组织 (WIPO) 的合作。而防止 INNs 被滥用作互联网域名也成为一个新的合作领域^[4]。

2. 国际药典——50 年

国际药典的出版已经持续了 50 年, 发展中国家通常利用简单的仪器进行技术难度较低的检验, 而国际药典充分满足了这些国家对特定药物和制剂的检验需要。出版药物成品的专著大有裨益。1999 年专家委员会建议较落后的技术应该与现代分析技术共同发展, 因为某些发展中国家也可以应用较复杂的技术^[4]。国际药典第五卷已经付印。WHO 已经出版了数部包括青蒿素衍生物在内的抗疟药的专著。1998 年颁布了包括药物、药用植物原料和剂型 (包括 345 项药物测试, 208 项剂型和 4 项植物原料测试) 在内的基础测试^[5]。WHO 化学标准物质合作研究中心 (位于瑞典的 Kungens Kurva) 可提供 69 个红外国际标准参考光

谱 (IIRS)。标准物质列表和红外对照光谱定期更新, 并可在互联网上查到 (<http://www.who.int/dmp/irin-tro.htm>)。

修订后的国家药品控制实验室操作规范 (GPCL) 指南已于 1999 年出版。它参考了 ISO 17025、EN 45001、OECD-GL 标准和药品检验公约 (Pharmaceutical Inspection Convention, PIC) 的指南^[4]。

3. WHO GMP 和质量保证体系

WHO 从 1998 年开始帮助资源受限的会员国实施 GMP 的特殊项目。WHO 首先确认了有意改进药品生产的国家, 并着手准备了基本 GMP 原则的培训材料, 并开发了高级 GMP 主题和审查的培训模块, 组织一些 GMP 培训员参加区域性培训研讨会, 讨论相关国家的目标^[4]。

目前已经完成的指导原则有: 无菌药品 GMP, 批准 (获得上市许可) 前审查指导原则, 国家 GMP 巡视员质量系统和药品包装材料通则^[4]。

1999 年, WHO 发布了有关药用原材料在英国、法国、西班牙、俄国、中国和阿拉伯的控制和安全交易的报告。这份报告是在 1998 年 5 月日内瓦专家会议所提建议的基础上做出的^[6]。日内瓦会议的召开与最近几起高毒性溶液剂二甘醇污染事件有关。

随着植物原料在世界范围内的广泛应用, 植物原料在非处方药、家庭医疗以及作为药物制剂原材料的应用引起了越来越多的关注。1998 年, WHO 出版了《药用植物原料质量控制方法》一书, 旨在满足实验室质控的需要, 同时为国家标准的发展提供参考^[7]。

WHO 指南及相关材料的摘要总结在《药物的质量保证》一书中, 第一卷已经发行^[8], 下一卷已付印。

假药: WHO 于 1999 年发布了检测和防止假药及劣药的相关指导原则^[9]。药物管理机构和 WHO 间官方联络网络的建立, 加强了 WHO 对假药的警戒和举报。

4. WHO 认证体系

越来越多的药品进出口国家的管理机构以 WHO 国际流通药品质量认证体系^[1]作为信息交换的标准工具。WHO 于 1999 年完成了分析标准认证, 内容涉及药品生产原材料的交易, 药物、辅料及医药用品制造商等^[4]。

等效性测试参照品系统: 在许多国家, 非专利药的使用越来越多, 面临越来越多的非专利药上市申请, 药品管理机构要对其提交的科学资料进行评估。WHO 规定, 对非专利药的质量、安全性和有效性的要求必须与原创药相

S

同^[10]。因此在体内生物等效性研究中,必须确认非专利药与原创药的治疗等效性和可互换性。为了协助药品生产商和管理机构开展这方面的工作,WHO 逐步确立了一系列国际标准参照品。WHO 先从药品管理结构收集参照品信息,然后与相关原创药企业协商,确定了一系列临时的候选名单。WHO 要求这些企业指定最能代表该产品质量、生产和标签的市场和商标。目前已有 147 种来自 WHO 基本药物参照品表的药品,并给出了详细的使用指南和在特殊情形下的决策意见^[11]。这些信息由 WHO 定时更新。

5. WHO 基本药物参照品表

基本药物参照品表于 1975 年设立,最近一次的评估和更新分别在 1997 年和 1999 年^[12, 13],补充了治疗疱疹感染的阿昔洛韦、治疗对 β -内酰胺酶耐药感染的阿莫西林+克拉维酸、治疗咳嗽的右美沙芬、治疗因脊椎麻醉导致的低血压的麻黄素、治疗假单胞菌感染的亚胺培南+西司他丁、治疗哮喘的异丙托溴铵、用于非胰岛素依赖性糖尿病治疗的二甲双胍、治疗肝肺吸虫的三氯苯咪唑和用于减少或预防 HIV 母婴传播的奈韦拉平及齐多夫定。此外,还讨论了降脂药物的价值,但由于成本高没有收录,只是推荐各国自己决定是否在高风险人群中使用这类药物^[12]。

5.1 在互联网上销售推广医药产品

互联网是一个快速扩张的媒体,具有很多用途和巨大的潜力,可用来发布和获得各种信息。这些信息涉及各个方面,如新治疗手段、公共机构提供的医疗、可购买的医药产品等。与传统的医药期刊和教材相比,人们可以更方便快捷地获取这些信息。组织、制药公司和个人可以发布和交换关于其目的、活动或产品的信息,甚至出售产品(包括医药产品)。然而,这些产品是否是被批准上市的,是安全性、有效性如何,是否有恰当的标识或品质优良呢?已经公布的案例显示,互联网上存在危险、有害、不可靠、伪劣药和标识有误的医药产品^[14]。

世界卫生大会(WHO 193 个成员国卫生部长年度峰会)1997 年 5 月对公众正越来越多的运用电子交流的方式来购买医药产品和收集健康教育、疾病、治疗等相关信息做出了正面回应^[15]。卫生大会对已出现的因不恰当使用互联网而对公共健康造成潜在危害的案例表示了极大的关注,决定召集 WHO 特别工作小组研究这类案例。工作组于 1997 年 9 月在日内瓦成立,由多方代表组成,包括卫生和药物管理机构、消费者团体、专家协会、制药产业、法律和伦理专家、市场推广和其他相关团体。工作组在总结当前形势后提出了一系列建议,这些建议涉及跨国界发布医药广告及推广、销售医药产品等。基于这些建议,世界卫生大会在 1998 年 5 月召开的年会^[16]上敦促所有成员国检查各自现有的法规条例和指导原则,确保它们适用并足以涵盖互联网上出现的医药产品的推广和销售。世界卫生大会要求各成员国建立互联网监控体系,并号召成员国之间在甄别棘手案例时通力合作,并通过 WHO 向外发布消息。

由有能力的卫生权威机构向消费者提供科学有效的信息绝对是必要的。

世界卫生大会呼吁向制药行业、健康专家、消费者组织及其他相关团体使用与 WHO 药品推广伦理标准原则一致的良好信息规范,监测并报告跨国界网上发布医药广告及推广、销售医药产品的问题案例,维护这些活动的法律和伦理标准。

世界卫生大会要求 WHO 鼓励国际社会建立良好信息规范的自我管理指导条例,并为成员国建立参照指南。指南应该教育和指导人们如何通过互联网获取可靠、独立而且合适的医药产品信息。WHO 参照指南——医药产品与互联网,于 1999 年发布^[17]。

5.2 生物制品

WHO 生物医药产品标准化工作中产生了许多全球性的应用规范、指导原则及应用指南。这里所说的生物医药产品包括疫苗、血液制品和诊断试剂。1999 年,WHO 发布了人用合成多肽疫苗的生产和质量控制的指南,以保证其持续的安全性和有效性^[18]。指南提出,需要对原材料(包括合成目标肽类的背景数据信息)、生产过程和最终产品进行控制。WHO 在制定对蜱传播的脑炎疫苗(灭活)的生产要求时考虑了当前的生产工艺和现场控制程序,并对这些工艺和程序的更新提出了指导^[18]。对采用 DNA 重组技术生产乙肝疫苗的要求进行了修订,以反映当前分析技术的进步,B 型嗜血杆菌组合疫苗的标准也属于这种情况。目前正在研究细胞因子免疫测定的标准化和校正,以及四价登革热活疫苗和口服小儿麻痹疫苗的规范要求^[18]。

1999 年,WHO 发布了生产和控制 B 型嗜血杆菌组合疫苗和单价或组合的非蜂窝状百日咳疫苗的规范要求,同时也修订了口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)的规范,增加了一些要求。WHO 发布了新的国际标准和参照物质,涉及到许多产品^[19]。

6. WHO、ICH 与地区的一致性

WHO 是 ICH 的观察员,WHO 作为国际政府间组织,以第三方身份参与了 17 个 WHO 成员国的 ICH 活动,从中发挥了巨大作用^[1]。

在 WHO 的大力支持下,ICH 指导委员会于 1997 年吸纳了来自国际非专利药物协会(IGPA)和世界自我药疗产业协会(WSMI)的专家加入指定的专家工作小组^[20],为开展更广泛的协调迈出了第一步。1998 年,WHO 以观察员的身份加入了药物活性成分生产质量管理规范的起草工作,是制药企业检查合作计划(PIC/S)的前期工作。澳大利亚、中国和印度作为药物和辅料的生产大国应邀参加了这次起草工作。指导原则草案仍在完善过程中,ICH 于 2000 年 2 月发布了其第二次修订的草案。

由于通用技术文件(CTD)(新药申请的内容和形式)已在 1998 年被认可为 ICH 的一项新主题,WHO 要求 6 个 WHO 区各选派一名药物顾问协调 ICH 的 CTD 工作小组和

各区药品管理机构的工作^[20]。这是一个重大进步,因为CTD无疑将对非ICH国家和企业的新药申请产生影响。CTD专家工作组于1999年成功签署了CTD全部三个部分的第二阶段的文件,三个部分分别命名为质量、安全性和有效性。现在仍有许多重要工作有待开展,质量方面进展最慢。

1999年,ICH开始对已有的稳定性试验指导原则进行重要修订。为了使这个原则在所有国家都实用可行,WHO建议在修订的版本中,不仅要包括新化学实体及其相关药品,而且要包括非专利药的稳定性测试。WHO进一步提议,除了当前的气候带I和II,该原则还应该考虑其余的气候带,如气候带III(高热/干燥)和气候带IV(高热/高湿)。包含非专利药物的常规剂型在内的WHO药物稳定性试验指导原则,一共覆盖了四个气候带^[21]。

参 考 文 献

- Idänpään-Heikkilä, J. E. WHO and the Harmonization of Regulatory Requirements for Medicinal Products. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 1st Ed.; Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; suppl. 1. Marcel Dekker, Inc.; New York, 1999; 18, 353—360.
- WHO. International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN). WHO Drug Information; 13, 1999; 1—4, WHO; Geneva, 1998; 12.
- WHO. Guidelines on the Use of International Nonproprietary Names (INN) for Pharmaceutical Substances; WHO/PHARM S/NOM 1570, WHO; Geneva, 1997.
- WHO. Technical Report Series. Report of the WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations; WHO; Geneva, 2000.
- WHO. Basic Tests for Drugs, Pharmaceutical Substances, Medicinal Plant Materials and Dosage Forms; WHO; Geneva, 1998.
- WHO. Starting Materials for Pharmaceutical Products; Control and Safe Trade; WHO/PHARM/98.605, WHO; Geneva, 1998.
- WHO. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials; WHO; Geneva, 1997.
- WHO. Quality Assurance of Pharmaceuticals; WHO; Geneva, 1997; 1.
- WHO. Guidelines for the Development of Measures to Combat Counterfeit Drugs; WHO/EDM/QSM/99. 1, WHO; Geneva, 1999.
- WHO. Drug Information 1999, 13, 158—162.
- WHO. International Comparator Products for Bioequivalence Testing. Drug Information 1999, 13, 158—162.
- WHO. Model List (revised in December 1997). Drug Information 1998, 12, 22—35.
- WHO. Model List (revised in November 1999). Drug Information 1999, 13.
- Idänpään-Heikkilä, J. E. Marketing Pharmaceuticals on the Internet. Medicines on the Internet. Communication from the Industry to the Patients, Nordic Council on Medicines, 52, NLN; Stockholm, 2000, 63—67.
- WHO. Cross-Border Advertising, Promotion and Sale of Medical Products Through the Internet; WHO/WHA 50. 4, WHO; Geneva, 1997.
- WHO. Cross-Border Advertising, Promotion and Sale of Medical Products Using the Internet; WHO/WHA 51. 9, WHO; Geneva, 1998.
- WHO. Medical Products and the Internet, A Guide to Finding Reliable Information; WHO/EDM/QSM/99. 4, WHO; Geneva, 1999.
- WHO. Technical Report Series, No. 889. Expert Committee on Biological Standardization; WHO; Geneva, 1999.
- WHO. Progress in Biological Standardization. Drug Information 1999, 13, 86—90.
- Idänpään-Heikkilä, J. E. ICH and the Common Technical Document (CTD). WHO Drug Information 1999, 13, 78—81.
- WHO. Technical Report Series No. 863, Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. WHO; Geneva, 1996.
- Idänpään-Heikkilä, J. E. Pharmaceutical Products; The International Harmonization and Collaboration Perspective. Focus on Pharmaceutical Research, Policy and Law; Valverde, J. L., Fracchia, G. N., Eds.; IOS Press, 1999, 25—34.

(葛庆华 译)

S

手性光学分析法

Neil Purdie

Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, U. S. A

引言

手性光学是一种使用光学检测设备的技术，能选择性地研究那些具有光学活性（手性）的物质和（或）分子，可用于结构研究和分析测定。有三种手性光学技术：

- 旋光测定 (polarimetry)，通常在单一波长处测定平面偏振光的角旋转；
- 旋光色散 (optical rotatory dispersion, ORD)，其测定的是平面偏振光的旋转角，它是波长的函数；
- 圆二色性 (circular dichroism, CD)，其测定的旋转角亦是波长的函数，只是光是圆形偏振光。

光能量的吸收对旋光测定或旋光色散不是必要的。然而，对圆二色性现象则是必要的，这使其成为对手性物质选择性最高的检测器。

理论

光学活性理论已经在大量论文中详细描述^[1~6]。法国宇宙学家 Arago 通过对冰洲石（一种 CaCO_3 的天然形态）的日光辐射透射试验研究，首次观察到这一物理现象。一年后的 1812 年，Biot 首次证明了某些有机化合物溶液也能旋转入射的偏振光束。1817 年，Biot 和 Fresnel 分别展开工作，报道了物质的旋转功能会随波长降低而增强，这种现象目前称为旋光色散 (ORD)。到 1846 年，Haidinger 报道了左和右圆形偏振光测定吸收的区别，这就是圆二色性的起源。

Pasteur 首先通过实验对光学活性理论给予了阐述，他观察到两种酒石酸结晶的半形对称性，这可用目测显示两种晶型的四个小面分别以右或左的方向朝向主晶面。他由拆分到的两种晶型制得的溶液能使线性偏振光向相反角方向旋转的观察，首次建立了宏观和微观或分子不对称性之间的直接联系。

1896 年，Drude 提出了光学活性的第一个理论模型。假设带电粒子（如电子）存在于不对称的环境中，就会局限于螺旋状移动。光学活性是电磁辐射和螺旋状电场之间相互作用的物理结果。早期理论尝试将分子几何模型，如四面体碳原子和 Drude 的物理模型相结合，基于使用耦合振荡器和分子极化率来解释光学活性。后来所有的量子力学方法都是基于扰动理论。多数理论实际上都是半经典的，因为量子理论需要很多简化和假设，使其实际应用受到限制，迄今为止没有广泛的理论能用于预测分子光学活性的符号和大小。

国际纯粹及应用化学联合会 (IUPAC) 定义的手性物质是指与左和右偏振光发生不同作用的物质。两类分子光学活性已经得到认识：内在的不对称性，表征为大的旋转强度；内在的对称性，但具有不对称干扰时，分子旋转强度会减小 1000 倍左右。

第一类基团的特征是分子中不存在对称平面，如六绣线菊苷。后一种类型需要在不对称中心附近存在生色团，如在不对称碳原子附近存在羰基。

旋光测定

人们认为非偏振光是由无数依赖时间的电磁场组成，它们是同相和相互成直角振动，振动平面与传播轴呈直角相交。光学活性的理论讨论中仅仅考虑到电矢量。线性偏振光仅用其中一个平面表示，是强度相同的两个同相成分方向相反的圆偏振的矢量之和（图 1）。实际上这些成分是随时间呈螺旋状传播的；然而，与传播轴呈直角的平面上的偏振投影是圆形的，因此获得的光描述为圆偏振光。

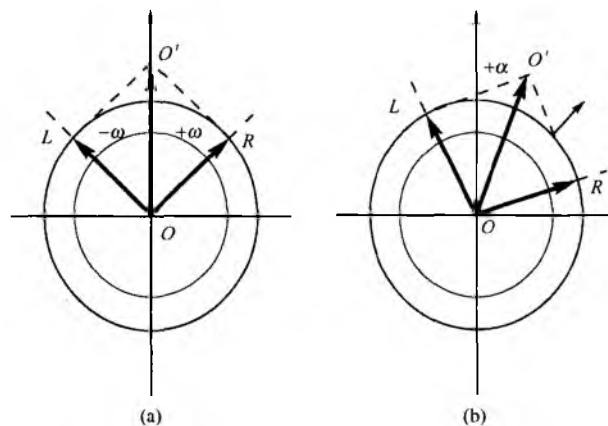


图 1 入射的线性偏振光 OO' 由左旋和右旋的等长线性偏振旋转成分 OL 和 OR 组成。(a) 在无手性介质中，旋转是在同相，结果是两成分总是与入射光在同一平面内；(b) 在手性介质中，两成分在异相旋转。合成结果用平行四边形 $OLO'R$ 的对角线表示，与入射平面旋转 $+\alpha$ 角度

当线性偏振光通过非手性介质传播时，通过两个圆形偏振成分观察到单个折光率 η ，它们的传播速度是相等的。结果是其矢量和为线性偏振光，取向入射光方向，如图 1 (a) 中的 OO' 。相反，由于存在于手性介质中的两个螺旋状电磁场和螺旋状电子运动之间的相互作用显著不同，因此用两个不同的折光率 η_L 和 η_R 来表示相干光束（双折射）。由于存在两个折光率，左旋和右旋成分做异相传播。

一旦加和传播束的矢量,如以 OL 和 OR 是相邻的平行四边形的对角线描述,偏振仍然呈线性;然而,将产生一个与入射方向成净旋转角 α [图 1(b)]。相同纯度的光学活性分子或镜像化合物对(对映体)的旋转强度相等、方向相反。

光学旋光度 α ($^\circ$) 的大小与折光率差值和样品光路距离 d 成正比,表明旋光是一种广泛的特性,如式 (1) 所示:

$$\alpha = (\pi d / \lambda) (\eta_L - \eta_R) (1800 / \pi) = (1800 d / \lambda) (\eta_L - \eta_R) \quad (1)$$

与波长成反比,减小波长可以观察到旋转强度增加。1800/ π 是指将弧度转换为度。若要在钠 D 线 590nm 处产生 1.0° 的旋光角,样品光路为 10cm,双折射 ($\eta_L - \eta_R$) 的大小仅为 3.2×10^{-8} 。因为折光率通常约为 1.0,很明显双折射效应的绝对值非常小。

为了统一不同浓度溶液的旋光值,定义比旋光度 $[\alpha] = \alpha / c \cdot d$, c 单位为 g/cm^3 。当比较摩尔质量 M 不同的物质时,这个单位是不合适的。因此将 $[\alpha]$ 用分子旋光 $[\Phi] = [\alpha]M/100$ 代替。在较早的文献中, $[\Phi]$ 用度数 $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ 表示。除以 100 没有物理意义,引入它的目的仅仅是为了保持数值较小。IUPAC 认为分子旋光这个术语是不恰当的,推荐用描述更加准确的摩尔旋光值替代。

旋光色散

1852 年, Biot 首次描述了旋光色散 (ORD) 的两种类型。在早期进行的石英定量实验中,他论证了旋光值 α 与波长的平方成反比: $\alpha = \kappa/\lambda^2$ 。通过对大量手性有机化合物进行测试,使用无化学和无光学活性的溶剂溶解,证实了大多数化合物都符合这条规律。这些最初被认为属于正统类型的化合物现在则被认为可以产生平坦的或者正常的 ORD 曲线。曲线特点是不管色散是正的还是负的,常常趋向于 $\alpha=0$ 轴 [图 2(a)]。然而,实际上不少有机分子不符合这条规律,与平坦曲线相比具有太大的旋光值,这在光谱中局限于相对狭窄的范围内。因为它们的反常行为, Biot 认为这属于异类 [图 2(b)]。酒石酸就是一个典型的例子。为了在这两类间更准确地加以区别, Lowry 规定,对于正常的 ORD 行为,比旋度 α 与其对波长的一阶、二阶导数在整个波长范围内都必须维持相同的符号,介质在波长范围内是透明的。换句话说,采用数学方法描述这种效应,即扫描光谱时, α 应该不会出现零值、最大值和负值,曲线总趋向于轴 [图 2(a)]。

关于反常色散起源的最初试验研究发现,产生平坦 ORD 曲线的一对天然产物能产生这种效应,假设它们具有相反的符号和不等的旋光强度,如 *l*-松脂和 *d*-樟脑。这个发现对于以后创建的反常色散理论来说是至关重要的。对于一种纯物质如酒石酸溶液来说,存在反常色散是很难解释的。最初假设能产生相反符号平坦曲线的两个分子等量混合物必须存在于溶液中。最终这种效应得到正确解释,具有两个不对称中心的分子能产生不等的相反旋光。

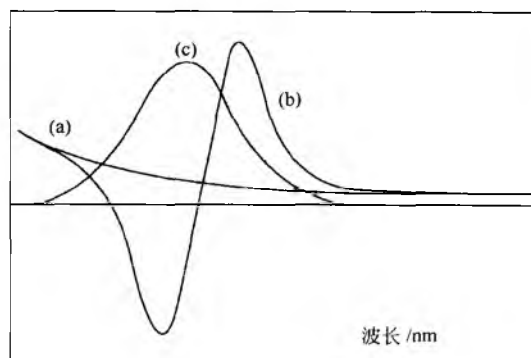


图 2 三种手性光学色散光谱集成示意图。(a) 正向平坦 ORD 曲线; (b) 正向反常 ORD 曲线 (Cotton 效应); (c) 单个 Cotton 效应的正向 CD 曲线

后来人们创建了几种数学模式和解释,但最好的解释是由 Drude 提出的,如公式 (2), 其中 $i=1,2,3,\dots,m$:

$$\alpha \sum_i \{k_i / \lambda^2 - \lambda_i^2\} \quad (2)$$

在现代术语中,用摩尔旋光值 $[\Phi]$ 代替 α , 用 A_i 代替 k_i 。Drude 最初把 λ_i 看成为特征振动波长,意思是存在电荷微粒的振动周期,当接近入射光的振动周期时就会产生反常效应。另外,在现代术语中还确定了电子吸收光谱范围内的最大吸收波长。当 $\lambda > \lambda_i$ 时,观测波长超出了吸收带的范围, Drude 公式简化成 Biot 的平坦曲线加以解释。当 λ 值接近 λ_i 时 α 无限增大,当 $\lambda = \lambda_i$ 时 α 接近无限大,很快超过最大波长, α 在数量上接近于无限负值,当 λ 继续减小时,曲线反转接近于零 [图 2(b)]。

图 2(b) 所示的正向反常 ORD 曲线在最大峰和最小谷末端的有限值附近。与轴交叉处的波长,即当 $\alpha=0$ 时,总是符合最大吸收波长。反常曲线总是位于基本平坦曲线之上,后者暗指背景旋光。证实具有单一反常色散的介质能解决 λ_i 。历史上,该程序用于预测不完全吸收带的最大波长,这种不完全吸收带由于仪器限制不能完全观测到。ORD 的这种特殊应用现在已经很模糊了。

为向法国物理学家 Aime Cotton 表示敬意,将反常曲线称为 Cotton 效应^[7],他在 1892 年首次指出光能量吸收时反常 ORD 和 CD 以外的其他物理特征。事实上,正和负的反常色散是同样显著的。在 ORD 中, Cotton 效应的符号是:当波长减少时,峰在谷之前通常定义为正;反之亦然。观察单一分子中 ORD 起源的一种简单结构方法,就是假设饱和手性基团的固有不对称性诱致了不饱和的也即对称的功能团或生色团的一些非对称度。理论而言 $\sigma-\sigma^*$ 电子跃迁对于饱和分子是可能的, λ_i 的理论限度被认为是约 150nm。反之,生色团在现代仪器能够做到的范围内在较长的波长处吸收。越接近于 150nm,光谱就越难测试。当诱导的非对称性与固有的不对称性信号相反时,都会产生反常色散。不对称中心和生色团的相互靠近是 CD 感应的先决条件。非对称性对于诱导手性来说是首选的解释,因为生色团可能具有轴的高度对称性。这种干扰是如何发生的目前尚得

不到满意的解释。

图 2(b) 是一个单一 Cotton 效应的理想化图形。实际上, 电子光谱很少出现完整的曲线。由于提高了光谱的分辨率, 在振动光谱范围内更有可能观察到完全色散。然而, 在该处由于谱带的重叠, 色散通常是复杂的。电子光谱同样如此, 隐藏的吸收带和振动激发耦合, 以及与其他手性生色团有关的谱带产生的干扰都能产生反常的 ORD 曲线。由于太过复杂, 它们对定量分析应用几乎没有多少价值(图 3)。

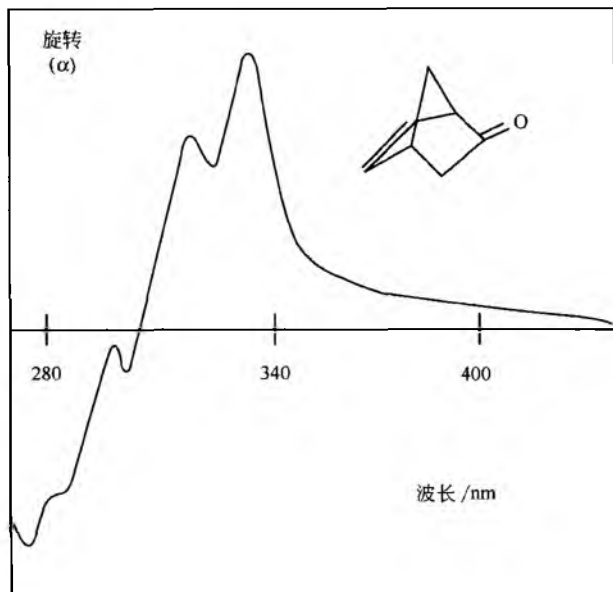


图 3 不饱和刚性酮、二环 [2, 2, 1] 庚-5-烯酮的由多个重叠 Cotton 谱带组成的反常 ORD 光谱, 由此可以显示即使简单分子的光谱也是很复杂的

圆二色性

由于吸收是圆二色性的先决条件, 所以这种现象仅限于在电磁光谱中任何可包含吸收带的那些波长范围内。在吸收范围之外, 圆形二色性的信号为零, 这是圆形二色性比起旋光色散作为分析检测器最主要的优势。需要强调的是, 带的存在并不能作为底物没有手性的证据。

当时 Cotton 正确解释了反常 ORD 行为的物理起源, 他提出了通过手性介质的两个圆形偏振光束的绝对吸收之间存在差异(二色性), 同时指出二色性的大小与吸收差成正比。另外, 规定了差值通常表示为左旋旋光束的吸光度减去右旋旋光束的吸光度, $\Delta A = A_L - A_R \neq 0$ 。应用 Beer-Lambert 定律将 A 转换为摩尔单位, 二色性的表达式也可重写为 $\Delta \epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$, 其中 ϵ 的单位是 $L/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。

在图 2(c) 中, 单一正向 CD 吸收带位于反常 ORD 光谱之上。最大 CD 波长与 ORD 色散的交叉波长是一致的。比起入射矢量, 矢量 OL 和 OR 的长度较短用于表达发生吸收的事实, 见图 1。指定波长处的吸收差值用不等的矢量长

度 $OL \neq OR$ 表示。 OL 和 OR 的合成量也就是平行四边形 $OLO'R$ 的对角线矢量 OO' , 不再在单一平面上, 当 OL 和 OR 旋转 2π 角时, 对角线矢量描绘成椭圆形周边的轨迹。透射光束绕原偏振面(由于双折射)旋转 α 角, 为椭圆形偏振(由于二色性)(图 4)。

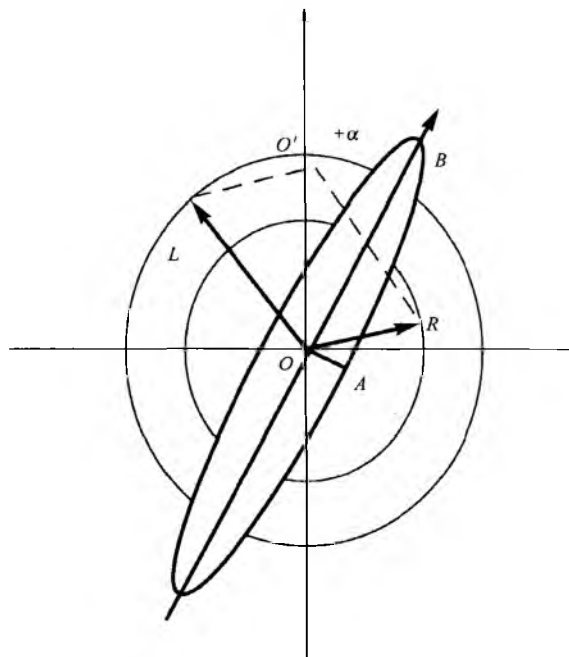


图 4 CD 中椭圆形偏振光的合成。入射光束的偏振方向是 OO' 。不等矢量 OL 和 OR 表示左旋和右旋成分光束在吸收上的差别。旋转角是 $+\alpha$, 椭圆率是反正切 (OA/OB)

椭圆形偏振光的离心率用术语椭圆率 ψ 表示, 等于椭圆短轴和长轴之比的反正切, 由 OA/OB 给出, 见图 4。因为产生可见 CD 信号的必要条件 $\Delta \epsilon / \epsilon$ 之比小至 10^7 , 椭圆率近似可以用表达式 $\psi = \pi (\epsilon_L - \epsilon_R) / \lambda$ 来表示, 完全类似于 Fresnel 方程, 在后面方程中, 双折射与 α 相关, 指出了反常 ORD 和 CD 的共同起源。

为了保留旋光测定的部分旧术语定义, 定义了比椭圆率 $[\psi] = \psi \cdot c' \cdot d$, 分子椭圆率 $[\Theta] = [\psi] \cdot M/100$, 其中 M 为摩尔质量。经合适的取代, 分子椭圆率能用术语 ϵ 表达, 也就是 $[\Theta] = 3300 (\epsilon_L - \epsilon_R) = 3300 \Delta \epsilon$ 。数字常数是所有物理转化因素的结果。由于文献中已有大量的信息数据故保留这些奇怪单位。CD 不仅仅是一种改进的吸光度技术, 这一揭露最终激发研究者采用术语摩尔椭圆率 Θ_M , 在 CD 中有类似 Beer-Lambert 定律的公式, 即 $y = \psi = \Theta_M c d$ 。

反常 ORD 和 CD 都源自于手性物质对光的吸收并含有同样的信息。一种数学方程 Kronig-Kramers 变换, 在吸收波长范围内将一个和另一个联系起来, 也就是说 $[\Theta(\lambda)] = -2/\pi [\Theta(\lambda')] (\lambda'^2 \lambda^2 - \lambda'^2) d\lambda'$ 。当做适当取代后, 与 ORD 和 CD 相关的方程简化为 $\Theta = 40.25 \Delta \epsilon$ 。

由于所有适用于吸光度检测的规则都同样适用于 CD,

因此习惯将 CD 看成是吸光分光光度测定法的改良方法。光谱具有温度和 pH 依赖性, 信号对浓度的非线性关系是普遍的, 这是由于化学平衡、多色辐射和杂散光等相同原因引起的。当分析物同时符合无论是内在的还是外在的, 所有三种结构先决条件时, 都能观察到荧光发射 CD (FD-CD) 光谱。因此, 任何对吸收和发射分光光度测定法有经验的人都会熟悉 CD 的实验。相似之处就是这些, 然而它们的不同之处使得 CD 检测具有唯一性, 特别是选择性增强源自 CD 带的信号可正也可负。电子吸收带通常较宽, 缺乏那种与红外有关的分辨率。与可见-紫外吸收相反, 激子耦合能将 CD 带分为两个相反信号的亚带, 特有的交叉波长 (信号等于零) 将它们分成不同的强度^[6], 导致其比任何吸收带都窄。圆二色谱多用于大量样品的分析, 在液相色谱和毛细管电泳中的应用有限。

CD 活性可被诱导入手性或非手性分子中, 通常认为是外在 CD。对于手性物质, 内在和外在 CD 效应是相加的。与内在 CD 相比, 外在或诱导手性光学效应很小。诱导活动性的一种方式就是应用一个静态磁场, 它的强度为 $10 \sim 20\,000\text{Gs}$ ($1\text{Gs} = 10^{-4}\text{T}$, 下同) 级。磁场诱导的 CD (MCD) 起初是由 Verdet 表述的, 法拉第正确加以解释后, 因此成为有名的法拉第效应。足够能量的磁场将电子基态和 (或) 激发态的简并裂分 (Zeeman 效应), 导致两个圆形偏振光束之间吸光度产生差异。这种效应是完全普遍的, 在每个能透光的介电物质中都能观察到。效应的大小依赖于光路和磁场的相对取向, 平行时最大。对于一个固定的几何体, 最大信号与样品光路长度及分析物浓度成比例。MORD 和 MCD 的低灵敏度甚至更差的选择性使其不能成为分析检测器。

另一个诱导手性光学特征的途径是利用一些聚合反应或络合反应使手性中心分子, 与另一个生色团分子相结合。如果手性部分是 CD 非活性的, 那么只有产生的复合物显示 CD 活性。决定诱导 CD 信号强度的两个因素分别是形成复合物的浓度和诱导 $\Delta\epsilon$ 的大小。化学诱导 CD 的大小和选择性大于 MCD, 因此其用于分析的前景更广阔。典型的是信号振幅和分析物浓度相关呈非线性。

仪器

事实上, 手性光学方法的常见仪器要求与其他分光方法一样, 也就是说, 稳定的、非偏振的、具有足够强度的光源、波长选择设备、样品固定器、检测器、偏振元件是必需的。由于在旋光测定和 ORD 中, 测定的唯一参数是偏转, 偏振元件对于两者来说是同样的。单色光源, 如钠或汞灯对旋光测定已足够。对于 ORD 来说, 氘灯或卤素灯具有足够的强度, 但是 CD 需要强度更高的氙灯 ($150 \sim 450\text{W}$)。

偏振元件为透明的菱形, 由两个三角形棱镜连接组成, 棱镜是从方解石或石英的单晶上切割下来的。两部分的结合处是空气或轻质香树脂黏合剂。结合的目的是将线

性偏振光束的普通射线与特别射线分开, 仅允许一种射线通过而另外一种选择性地向第一种的正角方向反射。通常来说, 反射射线能被完全吸收以消除对透射线的干扰。Lowry 曾对两部分集合组成可工作的旋光计做过卓越的注解^[1]。

在旋光测定和 ORD 中, 样品置于第一个偏振元件 (起偏镜) 与第二个偏振元件 (分析器) 之间, 其中起偏镜是固定的, 而分析器可以按传播轴旋转。当起偏镜和分析器的主轴位于同一线或平行时, 可观察到强度最大的透射光。当它们交叉时, 强度为零; 也就是说主轴相互直交。测定旋光角 α 的最准确方法是先用一个非手性底物, 使得起偏镜和分析器处于交叉位置 (光学零位), 当非手性底物被手性底物替代时, 可旋转分析器使光恢复到零位, 这样便可测量到旋光度了。

光学旋转时对温度具有依赖性。对于大多数精确测定来说, 样品池必须是温控的。偏振计检测的溶液浓度一般大于 0.2mol/L , 光路范围是 $1.0 \sim 100\text{mm}$; 体积 $0.1 \sim 50\text{mL}$ 。由于降低波长能够增加旋转变量, 使用传统光源的最大灵敏度可在紫外光区获得。据报道, 旋转大于 1.0° 时, 准确度在 $\pm 0.2\%$ 之间。只有最高级的高灵敏度旋光计符合色谱检测的要求。以稳定的激光系统作为光源, 弧度小至 $10^{-10} \sim 10^{-11}$ 的旋转都能够非常准确的被测量。对于色谱来说, 因为洗脱成分的浓度非常低, 受柱填料保留容量的限制, 以及洗脱液出口处的光路非常短, 高灵敏度是非常重要的^[8]。

20 世纪 50 年代, 出现了第一个商品化的 ORD 分光偏振计, 但是现在已经不再使用了。通常 CD 分光偏振计可提供一种外加件, 使可作为 ORD。

目前, 与扫描手性光学方法有关的技术难题使二极管阵列检测无法使用, 因此采用扫描双单色器设备选择 CD 波长 (图 5)。CD 的方块图与 ORD 仪器不同, 加入了电光调制器, 置于线性起偏镜之后, 以产生左右圆形偏振光束的相位分离, 它们是椭圆形偏振光束的起源。在第一个 CD 仪器中测定的物理参数是透射光束的椭圆率 (图 4)。如果测得吸光度的差值, 就能获得更好的准确性, 改善灵敏度, 这是当代每个 CD 仪器制造商的首选程序。

由于双单色器偏振和传播辐射时会损失大量能量, 需要将杂散光保持在绝对小的值, CD 检测的光源必须很强。因此, 为了除去氧气受高密度辐射产生的臭氧, 用氮气吹扫仪器部件。检测器为光电倍增管。市场可售的仪器波长范围为 $180 \sim 850\text{nm}$ 。振动光谱范围的仪器只有定做。椭圆率和 $\Delta\epsilon$ 的刻度应用选择的标准物质每天校准。刻度的校准与波长有关, 当研究范围非常宽时, 推荐使用一种以上的标准物质。近紫外光区常用的是雄甾酮、泛内酯、(+)-樟脑-10-磺酸和樟脑-10-磺酸铵以及可见光区的碱性镍 (II) 酒石酸。

由于 CD 活性仅在千万分之一数量级存在吸光度差异, 左和右的圆偏振光束透射强度的比值 (I_L/I_R) 在基本上是一, 如果直接测量 I_L 和 I_R , $\Delta\epsilon$ 的误差将非常之大。

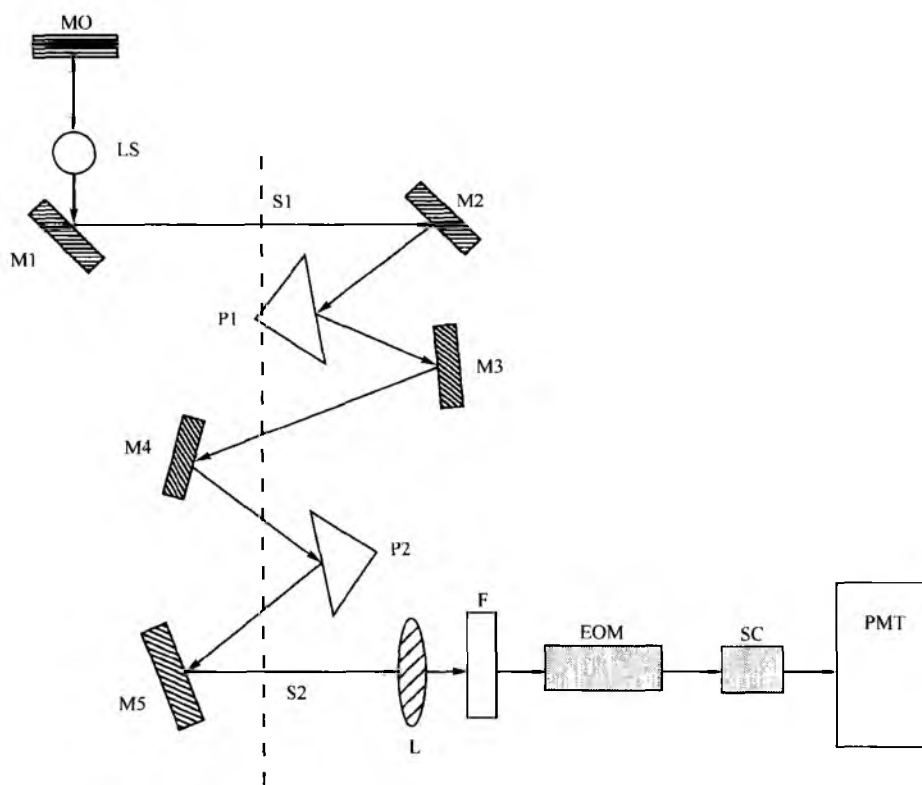


图5 商品化的双单色器 CD 分光偏振计的方块图。M. 各种镜体；S. 狭缝；P. 偏振元件；LS. 光源；SC. 样品；PMT. 光电倍增管；L, F 透镜和滤镜；EOM. 光电调制器

$$\Delta\epsilon = (\epsilon_L - \epsilon_R) = [(1/c \cdot d) \log(I_L I_R)] \quad (3)$$

在频率为 5kHz 时, 分别测定 I_L 和 I_R 的强度, 可以克服这个问题。这样就使叠加于 DC 之上的 AC 电压与 CD 信号成比例, 稳态 DC 成分与每一波长处的总吸光度成比例。 I_L 和 I_R 与稳态 DC 电压无关, 表明 CD 信号的大小与吸收的绝对量亦无关, 相对较强的 CD 信号可从整个弱吸收体中获得。虽然 CD 检测器测量的是吸光度的差值, 底物和基质的总吸光度仍是一个限制的特征, 这是因为其能够影响被测的透射光束强度。较弱信号的过度放大会增加噪音, 从而对 CD 信号的质量产生负面影响。

在可得的紫外范围内导致有机分子的吸收的主要电子激发, 是与芳香环有关的 $\pi\pi^*$ 跃迁和羰基的 $n\pi^*$ 跃迁。与 $\pi\pi^*$ 跃迁有关的激发概率较高, 吸光度非常强。为了保证信号的质量, 溶液必须非常稀和(或)光路非常短, 这是 CD 与 ORD 和旋光测定相比的第二个优势。光电倍增管 PMT 测定总透射强度, 但不能区分手性和非手性试样。过量吸收除了会影响信噪比外, 还会降低检测器的线性动态范围。在低浓度下限处, 决定因素是甚小的 CD 信号, 在高限处则由总吸光度决定。与常用的吸收检测相比, 使用范围通常更窄。

目前用于分析的商品化 CD 仪器受到电磁光谱的电子激发范围限制。更加复杂的仪器具有一些附加性能, 可以将洗脱液从离线色谱分离系统注入微池附件中, 替代了单一波长的有限检测, 从而获得部分 CD 光谱。进样体积可

以小至 10nL^[8]。振动 CD (VCD) 与拉曼光学活性 (ROV) 测定仪仍是定做的仪器, 虽然它们在将来的市场发展前景是光明的。其主要缺点是可调 IR 源的发射强度非常弱。

最近, CD 检测器引人注目的发展是使用同步加速器源拓宽到软 X 射线的波长范围^[9]。虽然这可能永远不会成为常规分析方法, 但据推测, 该范围内的 CD 测定有可能推断出溶液中任意大小手性分子的绝对构象。对于缺少其他方法时, 这使得其优于限于小分子的 NMR 检测和单晶 X 射线衍射结构的分析, 它假设溶液中的结构是相同的。

分析物选择

决定分析物是否具有 CD 活性, 并不总是简单地观察分子结构式, 并且确定有以一种可产生活性的方式共存的生色团和手性中心。即便分子结构表明存在手性的干扰生色团, 但是底物可能仅仅是非手性的外消旋体混合物, 因此不会被 CD 检测到。

CD 检测的合适波长范围是吸收最小, CD 信号最大。在大于 230nm 的波长处, $\pi\pi^*$ 跃迁和 $n\pi^*$ 跃迁的吸收通常非常弱, 在较短波长处的最大强带边缘出现肩峰。通常, 230~340nm 范围内的 CD 带足够强, 可以进行定量分析, 如睾酮和二氢睾酮的测定 (图 6)。

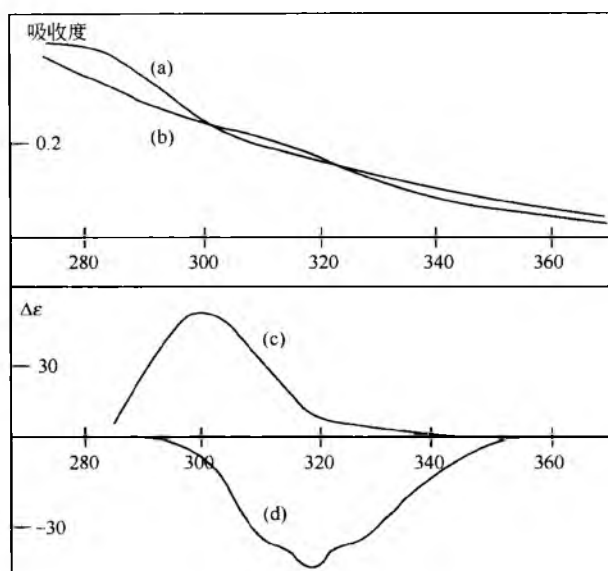


图6 二氯甲烷中二氢睾酮(a)和睾酮(b)的吸收光谱非常相似,而它们的CD光谱(c)和(d)却相反

分子共轭程度增强时, 电子激发能量向高波长转移。例如在有机染料分子中随着共轭产生结构平面的分子对称性, 潜在的非手性中心数量和可观测的内在 CD 活性机会可能减少。然而, 染料的强吸收能够通过与手性分子结合加以利用, 导致在高波长处产生外来 CD 活性, 基质的被动吸收往往不会产生干扰。其他具有这种性能的吸收体是具有颜色的手性金属复合物, 其优点是吸光度强度一般低于有机染料。

CD 和吸光度方法的相似之处同样存在于 CD 和荧光以及 CD 和圆形偏振发光 (CPL) 之间。产生 FD CD 和 CPL 活性需要满足三个必要条件^[8]。由于检测限大大降低, 通常与荧光相关的强发射信号还是很诱人的。FD CD 作为色谱检测器具有更多用途。某些分子的络合反应常可诱导 CD 信号。可能发生结合的是单一分子或分子凝聚体, 如手性束胶, 一般用作荧光增强剂。颜色感应与荧光感应相结合时, FD CD 也能对分析物保持更高的选择性, 这些分析物被同一显色试剂衍生化。

选择性增强是大量条件因素的结果。例如, 衍生物的吸收或者荧光光谱中不是所有亚带都具有 CD 活性的, 因为只有手性中心附近的生色团必须产生具有 CD 活性的荧光, 分析物或基质中心的其他荧光不会干扰 FDCD 信号。如果手性中心在衍生化过程中消失, 那么分子不再具有干扰作用。

色谱中的手性光学检测

在色谱检测器中,只有旋光测定和 CD 具有实用价值^[8]。色谱用手性光学检测器需要考虑的重要参数是极小样品体积,目前已经相对轻松地得到解决;以及分离连续

峰的时间间隔非常短, 至今乃至将来都难以解决。峰重叠是一个显著问题。在摩尔级, 检测限不特别引人注目, 例如毫摩 [尔] 水平, 但体积如小到 $1.0\mu\text{L}$, 检测限实际上达到纳摩 [尔] 到皮摩 [尔] 水平, 有时甚至更低^[10~14]。工程学首先开创了这项技术, 将光束聚焦到小目标上, 同时维持手性光学检测所需要的高水平辐射率。CW 激光是一种显著的开端, 但是面临源噪声和不稳定性等问题^[14]。利用脉冲激光增加辐射率, 检测限会达到更低水平。然而, 激光源的输出波长数量有限。染料激光通常最好, 虽然仍然很窄, 范围接近 60nm。现代 CD 仪器的光源是激光, 可以在单一波长处工作, 但是不能鉴别分析物。

现有进行多通道 LC-CD 检测的选购件^[14~16]。商品化仪器的停流附件可将部分洗脱液离线吸入并置于常规样品室的微池中,数据通过正常方式测定。该方法需要快速扫描性能。重复进样和平均多重扫描可以改善信号质量。在 HPLC-CD 检测早期,研发过程中最困难的是缺乏价位合适的有效仪器,唯一的选择是完全装备的 CD 仪器。

1998年, Jasco 国际公司引进了第一台商品化的偏振计检测器 OR-990, 以及第一个 CD 附带吸收检测器 CD-1595, 应用在 HPLC 中。CD 检测器在 220~420nm 范围内工作, 具有 20nm 的带宽。光源是 150W 汞-氙灯。进样通常在毫克范围内最低检测限约为 0.1ng。CD 检测器的灵敏度比 OR-990 检测器高 200 倍, 但是低于 CD-1595 吸收检测器 4 倍。当将 CD 和吸收检测器结合进行消旋体纯度测定时, 后者是限制因素。后一含量测定具有新含义, 即注重测定生物技术和药物工业中手性药物的消旋纯度。

最终这些设备成为 CD 二极管阵列检测器研制的开端。在线调节扫描速度和宽谱 CD 检测是一个很大难题。这个难题的主要原因是采集 CD 数据所需时间（即便使用最先进的二极管阵列技术的一个光谱）与色谱峰间典型的分散时间不协调。当更快的电子设备可供使用时，这种状态会得到改变。

如果 HPLC 柱中所有成分均可达到基线分离, 任何传统检测器都可以处理, 除非分离目的是判断或证实对映体的立体化学构象。在非手性系统中 [溶剂和 (或) 固定相], 对映体具有相同的保留时间, 不能得到分离。如果将两个检测器用于该系列化合物, 如 CD 和吸光度检测器^[17~19], 那么这个难题可以得到解决。由于对映体同时被洗脱出来, 吸光度检测器可以测定其总浓度, 而 CD 检测器可以测定 ΔA 差值。解该联立方程式, 可以得到两个对映体的浓度。

历史上, 当对映体比例大于 95 : 5, 或者只存在 5% 以内的外消旋体时, 该程序的实验限制会给出完全没有意义的结果^[20]。g 因子和洗脱带强度的主要成分分析 (PCA) 作为时间的函数, 这些概念已经成为解决这些实验限制的潜在方案, 能够提高对映体纯度测定的准确性^[21, 22]。如果峰宽不对称, 则特别有效^[22], 这是经常发生的。g 因子的定义是 CD 强度与吸光度强度之比 $\Delta A/A$, 其特点之一是对映体纯物质, g 值不会随浓度改变而改变。如果在洗

S

脱过程中 g 因子发生改变, 那么表明对映体不纯。记录外消旋体混合物中两个完全分离的纯对映体谱带理想轨迹应由具有相同和相反符号的恒定 g 值的两根水平线组成。在洗脱的时间间隔内, 轨迹被噪声很大的信号分离。这是因为在无 CD 活性物质被洗脱的范围内, g 因子相当于零被零除。采用 PCA 时, 共同洗脱的成分数量可用一系列现制组分的溶液组建的信号强度对时间的矩阵推导得来^[21]。

表面上看, 更好的方法是采用手性 HPLC 系统分离对映体, 通常是引入第三个手性物质, 与外消旋体混合物中的两个对映体进行反应。手性衍生试剂是流动相或者固定相的必备部分^[19]。产物是两种保留时间不同的非对映异构体衍生物。在经典实验中也使用这种原理, 如加入 (一)-二甲马钱子碱, 通过部分结晶分离对映体。只有 NMR 才能是唯一可行的选择以区别对映体。与手性色谱方法有关的大量问题是熟知的^[20,21]。

- 对映体纯度达到 100% 的手性衍生试剂数量很少;
- 如果物质具有几个手性中心, 保留时间的差异非常小;

- 实际上手性溶剂仅可作为流动相使用一次;
- 即便完成了衍生化, 也无法保证基线分离;
- 洗脱过程中可能发生分析物的外消旋化。

分离部分外消旋混合物的原则是考虑调整色谱条件, 使微量成分首先洗脱出来^[23], 不会被主要成分的谱带尾部覆盖而发生丢失。对于每一种用手性 HPLC 法测定含量的手性分析物来说, 当它们在 98%~100% 或者接近的范围内, 需要唯一性, 对映体过量测定中会有误差, 这就需要相当多的开发时间, 并对程序进行持续考察。

直接手性光学检测

在上下文中, 直接底物分离方法 (除了溶剂提取之外) 并不是分析工作的一部分^[24~26]。只有 CD 具有必需的选择性, 可以作为直接检测器。没有吸收的手性分子 (如最简单的糖) 不会产生干扰。具有吸收的非手性分子干扰会降低信噪比和检测限。最坏的干扰物包括药物中添加的天然色素和有色试剂。

来自于多个 CD 活性分析物的重叠峰也是一个值得考虑的问题, 虽然与吸光度相比, 发生在 CD 中的概率很小, 因为通常其峰型较窄, 且信号相反。恰当的曲线拟合算法可以解决重叠峰, 但是这类解决方法通常没有明确结果。人们越来越注重模式识别策略, 包括用化学计量学方法进行数据分析, 如主成分分析和人工神经网络^[27]。

对于未衍生化的分析物来说, 在 230~340nm 的首选波长范围内, 摩尔椭圆率只有 2 倍或 3 倍的差异。通过比较, 线性动态范围比这个更大, CD 信号间区间的受限性质是分析物浓度, 而不是手性生色团的旋转强度。使用直透射检测, 采用直接 CD 法测定原料药的限量, 是与吸光度测定类似, 对于 1.0cm 的光路大约为 100nmol/L。

标准 CD 光谱

对于标准对照物质 (SRM) 的 CD 光谱来说, 并没有全面的数据文件, 而在电子和振动光谱范围内, 已经建立了详尽的吸光度数据库。分析家要求创建他们自己的 CD 光谱文档, 使用一般的化学品供应商制备的 SRM。对于 SRM 的一个显著问题是即使其符合工业规格的化学纯度, 但是其对映体纯度仍是一个问题。能够绝对保证对映体纯度的例子极少, 除了全酶解控制的天然产物合成。100% 的对映体纯度被证明目前是达不到的^[20]。这个问题很复杂, 在天然环境中提取后有可能发生外消旋转换, 而且不可能有足够证据判断绝对的对映体纯度。

从表面上看, 对映体的 CD 光谱相互成镜像, 如果用于校准 CD 的两个 SRM 是对映体等量纯度的, 那么这种说法是正确的。即使光谱是确切的镜像, 也没有证据说明 2 个 SRM 是 100% 对映体纯的。当分析物分子中具有两个不对称中心, 也就是共有四个光学异构体 ($R,R;R,S;S,R;S,S$) 时, 会产生更多的复杂性。它们共组成两对非对映异构体, 所以具有两对等量的 CD 光谱。分析物鉴别和含量测定的错误也是有可能的。这些令人担忧的不确定性实际解决方案可以经常核对被认为是纯对映体纯的化学纯 SRM 光谱的重现性。每个新的 SRM 发表时都会附带其光谱数据, 不同制造商提供不同批号, 不断增加数据库, 同时参考光谱得到周期更新。当谱图分析合成的异构体混合物中的对映体过量或者对映体纯度时, 无法得到绝对对映体纯的标准物质显得更有现实意义。

应用

天然产物的分子结构中普遍存在着芳香环和羰基生色团, 这意味着可能采用本法进行分析的产物数量非常可观。早在 1960 年, Djerrasi^[2]就指出了手性光学方法的分析潜力, 但是到目前为止, 研究的数量还是很少, 一方面是因为拆分科学领域的苛求。多数分析者则认为困扰拆分的原因是干扰问题被忽略了。另一方面, 对于许多拆分过程, 它们的能力只能用于经仔细挑选的实验室混合物, 它们太多过于简单, 并不能适用于实际样品分析中遇到的复杂样品。

本节的重点是反映作者自己对使用 CD 检测直接测定手性物质的独特兴趣。系统描述的大部分内容是药物。在过去的 20 年内, 直接分析应用已经明显表明严重困扰问题的先前预计是没有确切根据的。与吸光度分光光度测定法相似, 分析灵敏度很容易达到, 由于相似性质可以获得高分析选择性, 使 ORD 和 CD 成为有用的结构工具, 也就是说生色团对手性环境的灵敏度^[3,6]。底物可分成三类:

- 具有手性生色团, 在近紫外光区具有吸收的底物;
- 手性或非手性的, 在可见光区无吸收, 衍生化后具有吸收的底物;
- 非手性的具有吸收的、与手性主体反应产生光学活

性的底物。

在近紫外光区具有吸收的手性生色团

该类的主要分析物有脂环族化合物(生物碱和萜类)、杂环化合物(巴比妥酸盐、苯并二氮革类、吲哚生物碱、喹啉、核酸和核苷酸)、氨基酸和肽类、寡肽、蛋白质(球蛋白、核蛋白、脂蛋白)、糖类和多糖、糖类与其他分析物的缩合物,如葡萄糖苷酸和糖蛋白^[26]。目前,大部分分析物是药物的固态或液态形式。某些文献报道了使用 CD 直接进行生物提取物的分析。

1. 吗啡生物碱

采用 CD 检测直接进行定量分析的第一类化合物是吗啡生物碱,其存在于水溶液中^[28],和手性胆甾型液晶溶剂中^[29]以及和 KBr 固体混合成丸剂的微球形式^[30]。与预期相反,在均匀水溶液介质中,10 种相关阿片类化合物的选择性最佳,定量结果最准确。在某些情况下,苯酚取代物的 pH 依赖性会使 CD 信号发生逆转,从而增强选择性。海洛因可以直接定量,也可以作为吗啡的水解产物进行定量^[31]。直接多组分分析可用于吗啡、可待因、蒂巴因、那可丁和阿片提取物的制备混合物^[32]。

2. 芳香胺

在苯乙胺和儿茶酚胺系列中,高度结构相似性和对映体形式的增殖性是分析中所遇到大量困难的主要原因^[20]。250~320nm 范围内的吸收谱带认为是芳香环的,而且是一致的。由于双折射因素,手性光学检测法比吸光度法略具优势,同时比电化学检测法具有许多优点。人们已经开发了 ORD 定量检测,用于分析麻黄碱和伪麻黄碱的混合物^[33]。在测定安非他命和甲基苯丙胺的过程中,体现出空前优势,即使故意添加非手性赋形剂,如利多卡因、普鲁卡因、苯佐卡因等来干扰吸光度的检测^[34]。这些添加剂在非手性液相色谱中具有的吸收光谱和保留时间与分析物十分相近。

3. 抗生素

所有四环素类化合物都具有强烈的可见 CD 光谱,它们之中可能存在一些差异^[35]。 β -内酰胺抗生素类具有非常接近的近紫外吸收光谱,使得某些类型的拆分成为可选择的测定方法。然而,在同时以相同的不精确度测定实验室制备混合物中的青霉素 V 和头孢菌素时,用 CD 检测青霉素类和头孢菌素类之间的差异,结果证明这是一种基本的运用^[36]。相反, β -内酰胺类各组分间的区分是困难的,要实现它多半需要预先化学衍生化。ORD 研究报告了可区分氨基糖苷抗生素新霉素 B 和 C。然而,多黏菌素和杆菌肽抗生素的 CD 光谱和吸光度都非常相似,不能进行直接分析检测,除非事先进行衍生化。

4. 生物碱

具有不同程度成功结果的其他生物碱类分析包括奎宁-

奎尼丁、辛可宁-金鸡纳碱、地高辛-洋地黄毒苷、L-天仙子胺-阿托品以及毛果芸香碱-异毛果芸香碱非对映异构体形式。因为它们是非对映异构体,所以具有不同的色谱保留时间,但是,当对映体混合物的组成改变时,测定会受到干扰。直接 CD 检测可对前两对非对映异构体的二元混合物进行定量^[37]。毛果芸香碱和地高辛可观测到的信号非常弱,以至于可能进行的分析局限于定性鉴别。秋水仙碱、土的宁、二甲马钱子碱和筒箭毒碱等强毒性生物碱的 CD 光谱都是在强酸性水溶液中获得的^[38,39]。它们的手性光学方法的分析尚未见报道。

5. 维生素

在维生素类中,水溶性维生素 B₂ 和 C 都具有 CD 光谱。当它们同时存在时,用直接测定进行区分是基本步骤。与维生素 B₂ 一样,它们也可以分析药剂提取物^[40]。脂溶性维生素 D₂ 和维生素 D₃ (钙化醇和胆钙化醇) 尚未得到成功分析^[38]。从天然产物中提取的维生素 D 具有单一的立体化学构象,而合成的存在不同的异构体。为了证实合成产物中存在天然形式,在其他异构体存在的条件下进行准确分析是一项非常艰巨的任务。直接 CD 检测能否令人满意地解决这个问题目前仍是未知数。所有异构体可能需要预先进行非选择性的衍生化反应。维生素 A 和 E 是非手性的,不能进行手性光学检测,除非首先与手性主体发生衍生化反应。

6. 甾体

Djerrasi 在甾体分析中使用手性光学检测法进行了开创性的研究,他完成了薯蓣皂素乙酸盐中的番麻皂素乙酸盐的测定^[2]。每个甾体都具有手性,因此可以在柱层析分离后进行旋光测定。生色团非常特殊,采用 ORD 或 CD 分析有些不合适。在胆固醇分子中,唯一的不饱和度是 Δ^5 双键,在 205nm 波长处有最大吸收。不饱和度和手性耦合能够提供一定的选择性,Potapov 对孕酮类似物的研究证实了这一点^[41]。比这个更加简单的就是睾酮和二氢睾酮的直接区分,它们在二氯甲烷中的信号相反(图 6)。

Gergely 促进了 ORD 方法在 Δ^4 -3-酮甾、17-酮和 17-乙炔衍生物分析中的发展^[42]。17-酮衍生物是 17-乙炔取代物合成过程中的杂质,能方便地使用混合物加权光谱,通过数学拟合光谱或者测定两种溶剂中的光谱进行定量。在第二个选择中,两个波长处的数据可建立联立方程算出两个成分的浓度。后者可用于定量测定皮质甾类和 Δ^4 -3-酮甾的混合物^[42]。为了得到最精确的结果,推荐使用具有完整光谱数据的化学计量学方法。

7. 碳水化合物

本节虽包括碳水化合物,但只有如酮基、氨基和羧酸酯取代的糖类,符合近紫外吸收的条件^[43]。完全饱和的糖类仅在小于 200nm 的波长处具有吸收,通常光谱是不完整的,多数都没有最大信号。在近紫外光区直接测定蜂蜜中的 D-果糖^[44]和甲壳贝壳中的 N-乙酰壳聚糖^[45]可获得完

整的分析数据。单糖常常存在于开放长链和环差向异构体的平衡混合物中^[46]，为了进行最准确和重现性的测定，必须建立平衡并控制温度。醛糖是一个典型例子，采用高效液相色谱法，在 300nm 左右波长处的吸光度进行测定。当要求得到洗脱剂对映体形式的信息时，可以使用旋光测定。Kuo 和 Yeung 结合两种检测器对实验室混合物中的糖类进行分析。优点是将焦点聚集于手性吸光体上，简化了对洗脱物的鉴别分析。在这些系统中使用 HPLC 和 CD 检测^[47]，最普通的就是最简单的酮糖、D-果糖、D-塔格糖、D-山梨糖、松二糖、D-核糖和维生素 C。

8. 氨基酸、肽类和蛋白质

与甾体和碳水化合物的 CD 检测有关的许多发现均适用于本类化合物。不经衍生化，仅有芳香侧链的氨基酸在近紫外光区才具有 CD 活性。信号通常较弱，采用旋光测定的对映体纯度检测不能进行定量。肽类和蛋白质具有较强的旋转能力，在临床分析时具有明显优势。不过，这些数据的主要用途是阐明水介质中的二级和三级结构信息^[20,48,49]。至于分析应用，那些作为辅助或者主体底物的大分子的主要任务是用于测定那些用立体控制方法结合到主体底物上的低相对分子质量的物质，如华法林结合到人血清白蛋白上时就优先选择 FD_{CD}^[50]。

为了达到分析小分子、测定异构体纯度、质量控制和定量构效关系 (QSAR) 等目的，在手性诱导中广泛涉及的这些物质，这将在下文叙述。这些应用的通用检测器是 CD。

9. 植物提取物中的天然产物

CD 分析选择性的一个特殊例子是其能够直接分析植物提取物中的天然产物。因为对于植物原料不存在对照品，所以结果处于物质预期的组分范围内，那么就认为是成功的^[51]。分析不是完全定量的。直接分析通常用于印度大麻提取物中的四氢大麻醇和大麻二酚^[52]、烟草和烟草产品中叶子提取物的 S-烟碱^[53]、发酵液中提取的青霉素 V^[36]和在各种全果、果汁和蔬菜中提取的维生素 C^[40]、萝芙木碱中的利血平生物碱^[54]、合成除虫菊酯杀虫剂^[11]、石蒜科生物碱^[17]、洋地黄中的阿托品^[24]以及蛇麻草中的葎草酮^[24]。最明显的严重干扰是植物色素的吸收和悬浮物质的光散射。CD 分析的优势是色素不会完全提取到所选溶剂中，这样近紫外光区没有吸收。

与这种最近的发现不同，当有色物质正好存在于同一相中，由于过度吸收，信噪比将减小。这种复杂的类型能用于直接分析处理，如有色违禁药物中的麦角酸二胺 (LSD)^[55]和苯环己哌啶 (PCP)^[56]，还有药物中的 L-可卡因、吗啡和美沙酮，也就是通常所指的 Brompton 鸡尾酒^[57]以及儿童 Sudafed 中的 D-伪麻黄碱^[37]。

通过颜色感应使底物具有 CD 活性

根据近紫外的研究已经发现，如果 CD 活性吸收谱带

迁移出基体吸光度最高的波长范围，CD 检测的选择性和灵敏度会大大加强。除个别例外，最少干扰的区域是可见光区。当存在于基质中的手性分析物通过选择性的颜色或荧光衍生化反应，波长会发生迁移。

从广义上讲，颜色衍生化分为可逆和不可逆反应。可逆反应一般包括一些复合物形成的平衡。颜色源自主体，形成复合物时又赋予给分析物。手性和吸光度的结合将产生 CD 活性，这仅仅局限于复合物。简单分析物上的简单主体或任何手性残留物的吸光度都无法检测，也不能形成干扰。由于是平衡反应，在实测的椭圆性和分析物浓度之间的相关是非线性的。这种程序性能完美简单的例证是测定人胆石中的胆固醇，手性胆固醇与有色胆红素结合，产生具有 CD 活性的复合物 (图 7)^[20,50,58,59]。类似反应也可用于天然色素。

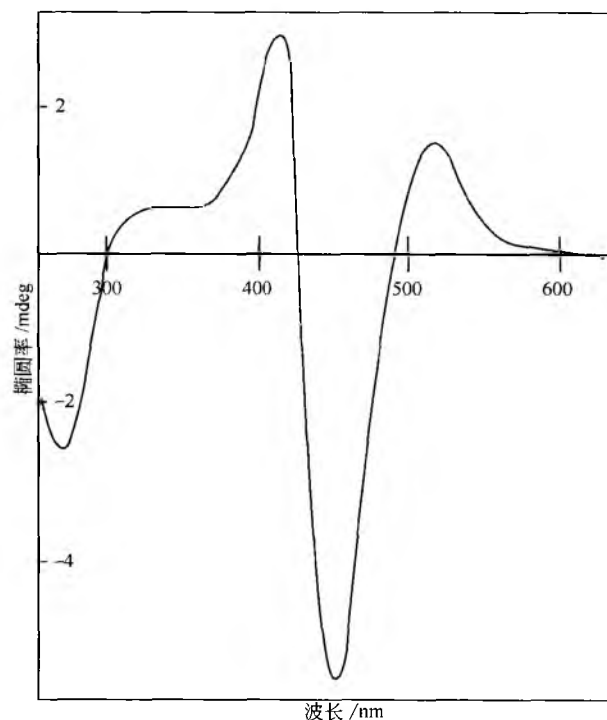


图 7 氯仿溶液中胆固醇和胆红素之间形成的复合物的外在 (诱导) CD 光谱

其他可作为可逆衍生化试剂且具有明显优势的有色主体分子是有机染料和第一过渡态金属复合物^[26]。染料本身具有很强的吸光度，而过渡态金属复合物并非如此，但其 CD 信号却具有相似的强度。染料在肽类、蛋白质、寡糖和多糖的 CD 分析中作为辅基，研究目的常常是探究溶液中结合位点处大分子结构的立体信息^[6,60]。作为主体最终将应用于简单分子、寡肽和核酸的化学分析。

有色金属复合物作为分子辅助试剂的例子是碱性铜 (II)-酒石酸盐，可用于总血浆蛋白质的常规检查，检测利用吸光度。如果用 L-对映体来替代酒石酸的外消旋体，那么分析试剂本身就具有 CD 活性。分析物配基与 L-酒石

酸的交换使主体复合物 CD 光谱发生显著改变, 这种改变不仅可用于提供第一络合区配基间发生相互作用的结构信息, 而且可作为分析方法, 使引入的配基具有选择性^[26, 61, 62]。这种分析采用 ORD 可检测新霉素 B 和新霉素 C 之间的分析差异^[26]。CD 检测的区分能力结合铜-L-酒石酸上的配基交换反应, 同样适用于阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、新霉素和链霉素等抗生素^[26] (图 8)。下面将阐述在较难测定的组分范围内, 测定对映体过量或比例的相同主体复合物^[61, 62]。

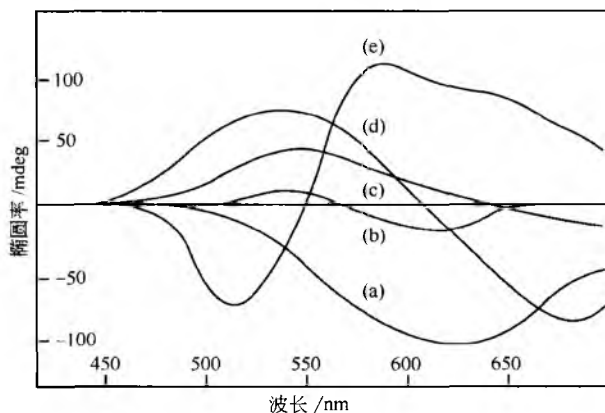


图 8 CD 光谱图。(a) 铜(Ⅱ)-L-酒石酸手性金属复合物; 这些主体与等摩尔量的 (b) 卡那霉素、(c) 阿米卡星、(d) 庆大霉素、(e) 链霉素形成的混合复合物

不可逆的颜色诱导在完成过程中需要更加机敏和仔细。如果扩展分子赖以产生颜色的不饱和度过大, 手性中心将会系统消灭, 这是必须避免的。反应条件非常不利。试剂一般是有毒的、有腐蚀性的, 反应条件要求无水, 如使用改良的 Chugaev 试剂检测血浆中的胆固醇^[63]。

通过手性诱导使底物具有 CD 活性

虽然标题表明分析物是非手性的, 但是也不一定必须如此。通过特定的内在和外在手性特性的相互影响, 产生的分析选择性越大。手性诱导反应通常是可逆的, 多数可扩展用于手性液相色谱^[12]。本文介绍的发展趋势是朝着手性光学检测和直接光谱检测应用方向的变化。当手性残基位于衍生化试剂中和生色团局限于分析物时, 就可以得到最佳条件。一旦反应, CD 活性对分子复合物是专属的, 不致有主体和客体可能存在的干扰。最佳的主体是线性的以及环状的寡糖和多聚糖, 如寡麦芽糖和环糊精都只在远紫外光区具有吸收。寡麦芽糖比环糊精的水溶性更好, 但是选择性较差。实际上, 许多用于手性色谱固定相的物质也可用于直接均相连接反应, 另外是穴合剂、小泡、胶束、肽、蛋白质、酶类、抗体和核酸。

复合物形成是一个平衡过程。推荐主体分子的质量大大多于分析物, 这样会使质量作用的影响最大化, 与分析物尽可能发生络合。形成常数越大, 实验获得的 ΔA 和分析

物浓度之间的相关性越好。 β 和 γ -环糊精作为分析试剂^[64] 可用于探索性研究, 测定巴比妥酸盐^[65]、苯乙胺^[64]、苯并二氮-2-酮^[66]、苯环己哌啶及类似物^[5] 的非手性形式。最初分析针对制备的实验室混合物, 但是也有这样的成功分析实例, 如速可眠栓剂中的司可巴比妥分析、德美罗医院制剂中的杜冷丁、制剂制备中的安定和氟胺安定^[66]。

在有机染料中, 由寡麦芽糖和寡纤维素通过手性诱导形成手性复合物的 CD 光谱, 可用于说明水性介质中主体螺旋结构的旋光方向^[60]。芳香残基如 9-蒽甲酯、对羟基肉桂酸盐和类似寡糖联合形成的手性衍生物 CD 光谱, 可用于探测环链接的局部立体化学和非环多羟基化合物相邻基团的构象排列^[26]。

蛋白质主体的吸光度和 CD 光谱在远紫外光区 (190~230nm) 具有强烈信号, 因此适合任何在较高波长处有吸收的分子中引入手性, 如蛋白质酶和 (或) 寡肽^[50] 和华法林结合的复合物、胆红素及其类似物^[26, 50, 58, 59]、某些染料分子^[63]。除了得到分析数据, 利用两个光谱范围也能监控活性部位的结构修饰: 远紫外光区的活性基团是肽键, 近紫外光区的吸光体是主体分子。此外, CD 可作为免疫测定中可供选择的检测器, 因为其实验选择性可以克服与多克隆抗体有关的局限性。

混旋体对映体过量的测定

对于所有类型的化学分析, 结果的性质最终都与最有用的 SRM 化学纯度有关。对于天然手性物质, 应更多地关注是由什么决定绝对对映体纯度。质谱虽然能够证明该物质为化学纯, 但是不能用于报告其绝对对映体纯度。事实上, 报告对映体纯度高于 99% 是超出分析方法能力的^[26]。正如前面提到的事实, 测定结果与定义为 100% 的对映体纯度有关。除了化学纯度, 对映体纯度和对映体过量测定在技术上是相似的, 区别在于外消旋化的程度。只有两个实验选择, 要么是对映体分离, 要么是多元分光镜分析, 后者包括两个不同的检测器或单一检测器的多波长检测, 正如前面提到的。新记载的衍生化反应可完成第二种选择。

如果选择的衍生化反应是手性诱导的, 简单的两步程序是测定未衍生化的混旋体的 CD 光谱, 然后测定混合物中加入衍生化试剂后的光谱。该反应基本上是与对映体可形成两个非对映异构体的物质, 如 β -环糊精形成简单的竞争性瞬时复合物。这可能存在不同的形成常数, 或者不同的诱导光谱, 或者两者皆有。尽管如此, 结果在原始 CD 光谱中是有变化的。通过求解联立方程, 可以计算出两个未知对映体的浓度, 这说明了在原始溶液中两个对映体和衍生化溶液中两个非对映异构体的加和性。该方法用于检测配制的 R-、S-烟碱非外消旋混合物的对映体分布, 获得部分成功^[26]。结果较差可能与光谱的变化较小有关。

通过将麻黄碱和伪麻黄碱配制的非外消旋混合物中的

对映体与 0.01mol/L 碱溶液中溶解的铜(II)-L-酒石酸主体复合物的配基 L-酒石酸交换,可以获得更精确的结果^[62]。第一个 CD 光谱是最初的复合物,第二个 CD 光谱是混合配基混合物,其中在铜(II)上键合的两个 L-酒石酸配基中只有一个与 (+)-或 (-)-麻黄碱或伪麻黄碱对映体交换。总信号是三者之和,也就是最初复合物降低了浓度获得的 CD 信号,加上铜(II)与一个 L-酒石酸和 (+)-对映体以 1:1 络合的 CD 信号,再加上铜(II)与一个 L-酒石酸和 (-)-对映体 1:1 络合的 CD 信号,对映体纯度的检测限在 $\pm 2\%$ 范围内。事实上,复合物 CD 信号的变化非常大,以至于采用四波长的旋光计测定也能轻易获得相等的结果。

CD 检测/配基交换——用于肽类、寡肽和蛋白质的分析

随着组合化学途径中出现成千上万种可能的药物,以及手性药物的进一步引起人们重视,低成本的常规质量控制程序开发成为药剂学和生物技术的重点。配基交换衍生化与 CD 检测偶合,成为肽类、寡肽和蛋白质测定的可能方法。

管理机构已经制订了手性药物的质量控制(QC)标准。如果公司决定将某种手性药物作为单一对映体(优势体)上市,所递交管理部门的批件中必须包括另一种非治疗对映体形式(劣势体)有关的手性信息。两种形式对映体纯度的准确测定是必需的。此外,随着时间推移,化学外消旋化会改变优势体与劣势体的比例,降低优势体的治疗特性。因此,QC 中另一个非常重要的因素是能够准确测定对映体纯度变化的比例,决定何时优势体的治疗效果已到期。

通过用 D-组氨酸替代上述铜(II)衍生化试剂中的 L-酒石酸配基,形成了用于配基交换的高选择性主体复合物^[67~71]。可见范围内 CD 检测的完整光谱所获得的分析选择性大多归功于配基之间特定的相互作用,这种作用表面上是发生在复合物第一配位层内。肽类、蛋白质获得的选择性程度非常高(图 9)。

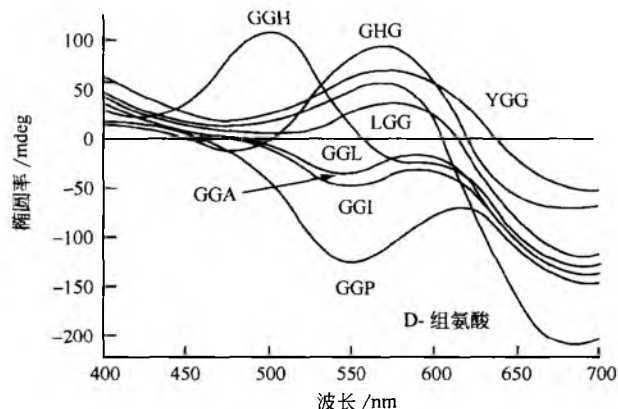


图 9 铜(II)-D-组氨酸主体和三肽系列混合复合物的 CD 光谱

CD 光谱变化对从结合位点移开的残基间氨基酸序列变化非常敏感。相关例子是个性化的 CD 光谱变化,如 D-组氨酸与人胰岛素、人 LysPro、猪和牛的胰岛素的交换,所有的都是 51 个氨基酸残基蛋白质^[70](图 10)。众所周知,碱液中与铜离子(II)结合的第一取代物蛋白质是通过氨基末端 N 原子完成的^[72]。通过 N 原子第一与第二肽基团使第二与第三取代物进入金属的第一络合层以完成整合,因为所有四个胰岛素的初始序列相同,配基交换时观察到的 CD 光谱变化是由其他一些结构变化引起的。胰岛素残基序列的唯一变化发生在 B-链的羧基端或附近。人胰岛素与人 LysPro(一种胰岛素类似物)的区别是在 B-28 和 B-29 处的赖氨酸和脯氨酸的简单交换。猪胰岛素和人胰岛素只有一个氨基酸差异,B-30 位苏氨酸被丙氨酸取代^[70]。唯一能解释这种现象的是金属离子能被柔韧的手性三维大结构包围,包围物构象的细微差别能将不同残基引入到配基中,引起金属离子的电子跃迁。D-组氨酸远远多于胰岛素分析物时,CD 信号与浓度之间具有非常好的定量线性关系。许多研究人员在药物模型中不能意识到的是当两个手性分子相互作用时,它们的立体构象会发生改变,药物作用机理的改变与其绝对构象的改变同样显著。

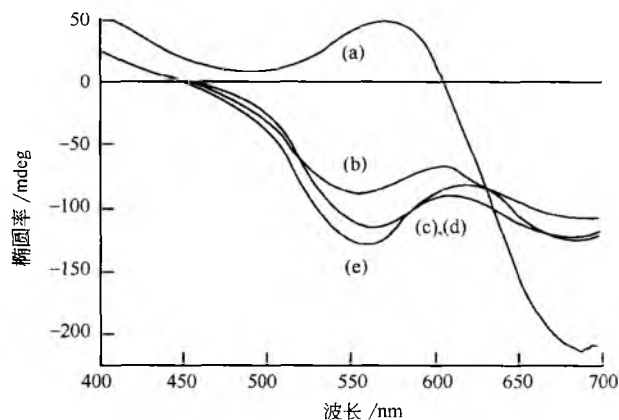


图 10 CD 光谱图。(a) 铜(II)-D-组氨酸主体复合物;与 (b) 牛胰岛素、(c) 人胰岛素、(d) 猪胰岛素、(e) 人 LysPro 胰岛素形成的混合配基复合物

配基交换/CD 检测分析的其他测试表明,53 个二肽和三肽中有 51 个能通过铜(II)-肽-组氨酸混合复合物的 CD 光谱变化来区分^[67,68,70]。另一项研究集中于 19 个神经肽系列^[69,71]。神经肽总是手性分子,由于肽键的存在,都具有 CD 活性。除了两个类似物,其他都能通过配基混合复合物的 CD 光谱加以区别。两个例外的化合物是 ICI174,864 和 PLO17,它们的末端氨基酸基团被取代,这样就不能与 D-组氨酸竞争结合铜(II)离子。换句话说,不会被取代。为了测定 CD 光谱是否具有与金属复合物的第一配位层结构相关的特征性质,CD 数据的 Y-相关矩阵作主成分分析(PCA)。所有光谱能用 4 种因素作数学处理^[71]。每个神经肽分析物的光谱数据能用两个主要成分 PC1 和 PC2 的 X-Y 图中的单点说明。当这些点符合等级聚类算法时,可以观

察到神经肽会根据它们各自的 δ 、 μ 、 κ 蛋白质受体发生聚集 (图 11)。这些校正模型可能成为相关 CD 分光数据与定量构效关系 (QSAR) 之间的原型-预测体外模型, 进一步证明可能成为新药的可行程序^[71]。尽管体系是一种混合的平衡反应, 在 PC1 与分析物浓度间存在良好的线性关系。

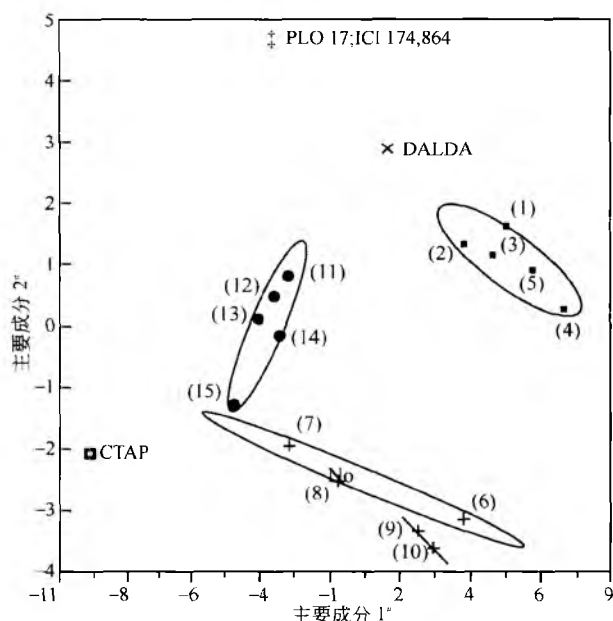


图 11 通过 PCA 由光谱数据衍生得到的第一和第二主成分簇状图。 δ 受体簇覆盖了 (1) DTLET, (2) DSLET, (3) DADLE, (4) α^2 -Leu⁵-脑啡肽和 (5) DPDPE。 μ 受体簇包括 (6) DAGO, (7) Met⁵-脑啡肽和 β -内啡肽。取代的 δ 受体簇由 (9) Leu⁵-脑啡肽和 (10) Leu⁵-脑啡肽氨基化合物组成。地诺芬的 κ 簇包含 (11) B (1~13), (12) A (1~13), (13) A (1~9), (14) A (1~11) 和 (15) A (1~13) 酰胺化合物。没有报道说明受体对 PLO17 或者 ICI 174864 具有优先性

多数神经肽中重复出现的手性性质中至少存在一个 D-对映体残基, 例如天然脑啡肽和合成脑啡肽, 如 DALDA、DAGO 和 DPDPE。确定 D-构型在序列中的位置是一项具有挑战性的工作, 已经对戊肽和己肽的模型进行了系统研究。D-对映体在生物工程药物中的作用非常重要, 尤其在近来对 D-丝氨酸存在认识, 它在大脑组织中作为神经递质^[73]。D-对映体在脑中通过丝氨酸消旋酶将天然的 L-型催化合成。

结论

本文的目的是基于大量的新实验数据, 阐述旋光测定法和 CD 可以作为可行的、便于使用的分析检测方法, 因为它们具有足够的分析选择性和灵敏性。与其他检测器相比, 它们具有直接分析的性能, 样品合成后通过简单的溶剂提取就可测得对映体的纯度, 其范围在 FDA 规定的手性新药质量监控之内。将来的应用将会越来越宽, 尤其是在目前的分析重点转变为核酸蛋白质的相互作用和完整的单细胞 CD 性质时。

参考文献

- Lowry, T. M. Optical Rotatory Power; Dover Publications; New York, 1935.
- Djerrasi, C. Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry; McGraw-Hill; New York, 1960.
- Charney, E. The Molecular Basis of Optical Activity. Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism; Wiley; New York, 1979.
- Schnatzke, G. Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry; Heyden; London, 1967.
- Crabbe, P. ORD and CD in Chemistry and Biochemistry. An Introduction; Academic Press; New York, 1972.
- Harada, N.; Nakanishi, K. Circular Dichroic Spectroscopy: Exciton Coupling in Organic Stereochemistry; University Science Books; Mill Valley, CA, 1983.
- Cotton, A. Compt. Rend. 1895, 120, 989.
- Bobbitt, D. R. Analytical Applications of Circular Dichroism. Technical Instrumentation in Analytical Chemistry; Purdie, N., Brittain, H. G., Eds.; Elsevier; Amsterdam, 1994; 14, Chap. 2.
- Sutherland, J. C. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules; Fasman, G. D., Ed.; Plenum Press; New York, 1996.
- Synovec, R. E.; Yeung, E. S. Fluorescence Detected Circular Dichroism as a Detection Principle in High-Performance Liquid Chromatography. J. Chromatogr. 1986, 368, 85-93.
- Lloyd, D. K.; Goodall, D. M.; Scrivenner, H. Diode-Laser-Based Optical Rotation Detector for High-Performance Liquid Chromatography and On-Line Polarimetric Analysis. Anal. Chem. 1989, 61, 1238-1243.
- Christensen, P. L.; Yeung, E. S. Fluorescence-Detected Circular Dichroism for On-Column Detection in Capillary Electrophoresis. Anal. Chem. 1989, 61, 1344-1347.
- Yeung, E. S.; Synovec, R. E. Detectors for Liquid Chromatography. Anal. Chem. 1986, 58, 1237-1256.
- Takakuwa, T.; Kurosu, Y.; Sakayanagi, N.; Kaneuchi, F.; Takeuchi, N.; Wada, A.; Senda, M. Direct Combination of a High Performance Liquid Chromatograph and a Circular Dichroism Spectrometer for Separation and Structural Analysis of Proteins. J. Liq. Chromatogr. 1987, 10, 2759-2769.
- Westwood, S. A.; Games, D. E.; Sheen, L. Use of Circular Dichroism as a High-Performance Liquid Chromatography Detector. Chromatography 1981, 204, 103-107.
- Mannschreck, A. On-Line Measurement of Circular Dichroism Spectra During Enantioselective Liquid Chroma-

- tography. *Trends. Anal. Chem.* 1993, 12, 220—225.
17. Boehme, W.; Wagner, G.; Oehme, U. Spectrophotometric and Polarimetric Detectors in Liquid Chromatography for the Determination of Enantiomer Ratios in Complex Mixtures. *Anal. Chem.* 1982, 54, 709—711.
18. Meinard, C.; Bruneau, P.; Perronett, J. High-Performance Liquid Chromatograph Coupled with Two Detectors: A UV Spectrometer and a Polarimeter. *J. Chromatogr.* 1985, 349, 109—116.
19. Ward, T. J.; Armstrong, D. W. *Chromatographic Science Series Chromatographic Chiral Separations*; Zief, M., Crane, L. J., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1988; 40.
20. Zukowski, J.; Tang, Y.; Berthod, A.; Armstrong, D. W. Investigation of a Circular Dichroism Spectrophotometer as a Liquid Chromatography Detector for Enantiomers: Sensitivity, Advantages, and Limitations. *Anal. Chim. Acta.* 1992, 258, 83—92.
21. Kudo, K.; Ajima, K.; Sakamoto, M.; Saito, M.; Morris, S.; Castiglioni, E. New Circular Dichroism (CD) Based Detection for Monitoring Chiral Compounds in HPLC. *Chromatography* 1999, 20, 59—64.
22. Horvath, P.; Gergely, A.; Noszal, B. Determination of Enantiomeric Purity by Simultaneous Dual Circular Dichroism and Ultraviolet Spectroscopy. *Talanta* 1997, 44, 1479—1485.
23. Lodevico, R. G.; Bobbitt, D. R.; Edkins, T. J. Determination of Enantiomeric Excess Using a Chiral Selective Separation Mode and Polarimetric Detection. *Talanta* 1997, 44, 1353—1363.
24. Purdie, N.; Swallows, K. A. Analytical Applications of Polarimetry, ORD, and CD. *Anal. Chem.* 1989, 61, 77—86.
25. Purdie, N.; Swallows, K. A.; Murphy, L. B.; Purdie, R. B. Circular Dichroism. II. Analytical Applications. *Trends Anal. Chem.* 1990, 9, 136—142.
26. Purdie, N. Analytical Applications of Circular Dichroism. *Technical Instrumentation in Analytical Chemistry*; Purdie, N., Brittain, H. G., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1994; 14, Chap. 8.
27. Martens, H.; Naes, T. *Multivariate Calibration*; Wiley: New York, 1989.
28. Crone, T. A.; Purdie, N. Circular Dichroism Spectra of Opium Alkaloids in Aqueous Media. *Anal. Chem.* 1981, 53, 17—21.
29. Bowen, J. M.; Crone, T. A.; Hermann, A. O.; Purdie, N. Circular Dichroism Spectra of Opium Alkaloids in a Cholesteric Liquid Crystalline Solvent System. *Anal. Chem.* 1980, 52, 2436—2440.
30. Bowen, J. M.; Purdie, N. Circular Dichroism Spectra of Opium Alkaloids in the Solid State. *Anal. Chem.* 1980, 52, 573—575.
31. Bowen, J. M.; Crone, T. A.; Kennedy, R. K.; Purdie, N. Determination of Heroin by Circular Dichroism. *Anal. Chem.* 1982, 54, 66—68.
32. Han, S. M.; Purdie, N. Simultaneous Determination of Opiates by Circular Dichroism. *Anal. Chem.* 1986, 58, 113—116.
33. Potapov, V. M.; Demianovich, V. M.; Terentiev, A. P. Spectropolarimetric Analysis. IV. Polarimetric Analysis of Ephedrines and Pseudoephedrines in Their Mixtures. *Zh. Anal. Khim.* 1964, 19, 254—257.
34. Bowen, J. M.; Crone, T. A.; Head, V. L.; McMorrow, H. A.; Kennedy, R. K.; Purdie, N. Circular Dichroism: An Alternate Method for Drug Analysis. *J. Forensic Sci.* 1981, 26, 664—670.
35. Mitscher, L. A. *The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics*; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1978; 13.
36. Purdie, N.; Swallows, K. A. Direct Determination of Beta-Lactam Antibiotics by Circular Dichroism. *Anal. Chem.* 1987, 59, 1349—1351.
37. Engle, A. R., Ph.D. Dissertation. Oklahoma State University; Stillwater, OK, 1993.
38. Han, S. M.; Purdie, N. Determination of Stereoisomers by Circular Dichroism. *Anal. Chem.* 1986, 58, 455—458.
39. Purdie, N. Determination of Drugs of Abuse and their Stereoisomers by Circular Dichroism. *Forensic Sci. Rev.* 1991, 3, 1—16.
40. Purdie, N.; Swallows, K. A. Direct Determination of Water Soluble Vitamins by Circular Dichroism. *J. Agr. Food Sci.* 1991, 39, 2171—2175.
41. Potapov, V. M.; Demianovich, V. M.; Rakovska, R. S. Analytical Applications of Spectropolarimetry. *Zh. Anal. Khim.* 1984, 39, 983—996.
42. Gergely, A. A Review of the Application of Chiroptical Methods to Analytical Chemistry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1989, 7, 523—541.
43. Johnson, W. C., Jr. The Circular Dichroism of Carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1987, 45, 73—124.
44. Hayward, L. D.; Angyal, S. J. A Symmetry Rule for the Circular Dichroism of Reducing Sugars, and the Proportion of Carbonyl Forms in Aqueous Solutions Thereof. *Carbohydr. Res.* 1977, 53, 13—20.
45. Domard, A. pH and CD Measurements on a Fully Deacetylated Chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 1987, 9, 333.
46. Kuo, J. C.; Yeung, E. S. Determination of Carbohy-

- drates in Urine by High-Performance Liquid Chromatography and Optical Activity Detection. *J. Chromatogr.* 1981, 223, 321—329.
47. Kimura, A.; Chiba, S.; Yoneyama, M. A Simple and Rapid Determination of Ketoses by Circular Dichroism. *Carbohydr. Res.* 1988, 175, 17—23.
 48. Fasman, G. D. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*; Plenum Press: New York, 1996.
 49. Jirgensons, B. *Optical Activity of Proteins and Other Macromolecules*, 2nd Ed.; Springer Verlag: New York, 1973.
 50. Thomas, M. P.; Patonay, G.; Warner, I. M. Fluorescence-Detected Circular Dichroism Studies of Serum Albumins. *Anal. Biochem.* 1987, 164, 466—473.
 51. Souci, S. W.; Fachmann, W.; Kraut, H. *Food Composition and Nutrition Tables*, 2nd Ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 1981.
 52. Han, S. M.; Purdie, N. Determination of Cannabinoids by Circular Dichroism. *Anal. Chem.* 1985, 57, 1068—1072.
 53. Atkinson, W. M.; Han, S. M.; Purdie, N. Determination of Nicotine in Tobacco by CD Spectropolarimetry. *Anal. Chem.* 1984, 56, 1947—1950.
 54. Purdie, N.; Swallows, K. A. Determination of Reserpine by Circular Dichroism. *Pharm. Res.* 1989, 6, 521—524.
 55. Bowen, J. M.; McMorro, H. A.; Purdie, N. Determination of LSD in Drug Confiscates by Circular Dichroism Spectropolarimetry. *J. Forensic. Sci.* 1982, 27, 822—826.
 56. Bowen, J. M.; Purdie, N. Identification of Cocaine and Phencyclidine by Solute-Induced Circular Dichroism. *Anal. Chem.* 1981, 53, 2239—2242.
 57. Atkinson, W. M.; Bowen, J. M.; Purdie, N. Determination of Brompton's Cocktails by CD. *J. Pharm. Sci.* 1984, 73, 1827—1828.
 58. Blauer, G. Complexes of Bilirubin with Proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1986, 884, 602—605.
 59. Blauer, G. Optical Activity of Bile Pigments. *Israel J. Chem.* 1983, 23, 201—209.
 60. Engle, A. R.; Hyatt, J. A.; Purdie, N. Induced Circular Dichroism Study of the Aqueous Solution Complexation of Cello-Oligosaccharides and Related Polysaccharides with Aromatic Dyes. *Carbohydr. Res.* 1994, 265, 181—195.
 61. Engle, A. R.; Lucas, E. A.; Purdie, N. Determination of Enantiomers of Ephedrine Mixtures by Polarimetry. *J. Pharm. Sci.* 1994, 83, 1310—1314.
 62. Engle, A. R.; Purdie, N. Determination of Enantiomeric Purities Using CD/CD Detection. *Anal. Chim. Acta.* 1994, 298, 175—182.
 63. Purdie, N.; Murphy, L. H.; Purdie, R. B. Serum Cholesterol: A Direct Measure of the Low Density Fractions. *Anal. Chem.* 1991, 63, 2947—2951.
 64. Han, S. M.; Atkinson, W. M.; Purdie, N. Solute Induced CD; Drug Discrimination by Cyclodextrin. *Anal. Chem.* 1984, 56, 2827—2830.
 65. Han, S. M.; Purdie, N. Cyclodextrin Complexation of Barbiturates in Aqueous Solution. *Anal. Chem.* 1984, 56, 2825—2827.
 66. Han, S. M.; Purdie, N.; Swallows, K. A. Determination of the Benzodiazepin-2-Ones by Circular Dichroism. *Anal. Chim. Acta* 1987, 197, 57—64.
 67. Purdie, N.; Province, D. W. Algorithms for the Quantitative Validation of Chiral Properties of Peptides. *Chirality* 1999, 11, 546—553.
 68. Purdie, N.; Province, D. W.; Johnson, E. A. Tripeptide Discriminations Using Circular Dichroism Detection. *J. Pharm. Sci.* 1999, 88, 715—721.
 69. Purdie, N.; Province, D. W.; Johnson, E. A. A Convenient Assay Method for the Quality Control of Peptides and Proteins. *J. Pharm. Sci.* 1999, 88, 1242—1248.
 70. Purdie, N.; Province, D. W.; Layloff, T. P.; Nasr, M. M. Algorithms for Validating Chiral Properties of Insulins. *Anal. Chem.* 1999, 71, 3341—3346.
 71. Purdie, N.; Province, D. W. Clustering of CD Spectral Data as a Prototype QSAR Model for Neuropeptides. *J. Pharm. Sci.* 1999, 88, 1249—1253.
 72. Sigel, H.; Martin, R. B. Coordinating Properties of the Amide Bond. Stability and Structure of Metal Complexes of Peptides and Related Ligands. *Chem. Rev.* 1982, 82, 384—426.
 73. Snyder, S. H.; Wolosker, H.; Blackshaw, S. Serine Racemase: A Glial Enzyme Synthesizing D-Serine to Regulate Glutamate-N-methyl-D-Aspartate Neuro-Transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 13409—13414.

(陈燕 陈阳 译)

S

兽用剂型

J. Desmond Baggot

Monash University, Parkville, Victoria, Australia

引言

兽用剂型是人为设计的用于一种或多种家养动物或其他动物的药物制剂。尽管绝大多数兽用制剂所含的药物与人用制剂相同,但某些兽用制剂中的药物并未广泛应用于人群。例如,苯并咪唑类驱虫药、大环内酯类抗寄生虫药、水杨酸苯胺类杀吸虫药、合成除虫菊酯类、氯霉素衍生物、 α_2 -肾上腺素受体激动剂(镇静镇痛药)和阻断剂。另一些药理活性物质(如苯二氮草类衍生物,三环抗抑郁剂)则因对动物的临床适应证有限而较少使用。兽医药理学在有关生物的多样性以及各类药物的侧重点方面与医用药理学存在差异。适用于人和某些动物种类的剂型包括注射用溶液(但需要考虑制剂中的药物浓度、载体性质和其他成分),传统片剂和胶囊(必须考虑载药量和剂量的要求),口服溶液和混悬剂(儿童用制剂通常适用于小动物给药,尤其是猫),以及传统的眼用制剂。人用的缓释片剂和透皮控释给药系统可用于中型至大型成年犬。由于各物种或种内近缘属群具有独特的生理特性,且药理活性物质的剂量-效应关系在不同物种间存在差异,因此需要将药物设计成兽用制剂。专门设计的用于特定动物的兽用剂型包括抗菌药物的长效肌肉注射剂,含抗菌药或驱虫药的马用口服糊剂,含

非甾体抗炎药或驱虫药、供加入马或猪饲料中使用的颗粒剂,含驱虫药的牛羊用修饰释放瘤胃丸剂,奶牛乳用抗菌制剂,可用于多种动物的含抗体外寄生虫剂的外用制剂,以及用于捕获或限制外来动物的含镇静剂的标枪。对于食用动物的兽用制剂,常规要求在动物组织和动物制品(奶和蛋类)中不得残存药物。

兽用药物

大多数兽用制剂最初都是基于来自实验动物的研究结果开发而供人使用的,但某些药物则是专为动物研制的。兽用药物以驱虫药和抗体外寄生虫药(或杀虫药)为主。一些驱虫药(如伊维菌素、甲苯达唑、阿苯达唑、噻嘧啶、哌嗪、左旋咪唑、吡喹酮、硫氯酚)已经用于治疗人体的寄生虫感染。多数抗体外寄生虫剂仅作为兽用药物。某些类型的抗菌药也仅用于动物,包括磺胺类、氟喹诺酮类、大环内酯类、氯霉素衍生物、羧基离子载体。尽管有些药物声称仅用于动物而不适用于人(表1),但一开始就作为兽用药物开发的药理活性物质很少,多数药理活性物质则主要是由于在动物实验中表现出疗效或者是被人用药物所取代,才作为兽用药物的,如保泰松、奎尼定、苯巴比妥和硫喷妥。

表1 一些动物专用的药理活性物质

药物	类别	适应证
二甲苯胺噻嗪	α_2 , (α_1)-肾上腺素受体激动剂	镇静、镇痛麻醉剂
育亨宾	α_2 , (α_1)-肾上腺素受体阻断剂激动剂	与二甲苯胺噻嗪相反
塞拉唑	α_2 -肾上腺素受体	麻醉剂
阿替美唑	α_2 -肾上腺素受体阻断剂	与塞拉唑相反
乙酰普马嗪	酚噻嗪衍生物镇定剂	麻醉剂、镇静
埃托啡-乙酰普马嗪	强阿片受体激动剂-PTZ衍生物镇定剂	安定镇痛
特培洛非	阿片受体阻断剂	与埃托啡相反
氟哌利多-芬太尼	苯丁酮 μ -阿片受体激动剂	安定镇痛
Azeperone	苯丁酮	麻醉剂、行为矫正(猪)
阿法多龙-阿法沙龙	甾体麻醉剂(禁用于犬)	麻醉
氟尼辛	环氧化酶抑制剂	抗炎、镇痛、解热
安乃近	环氧化酶抑制剂	(与其他非甾体抗炎药近似)

性激素、促性腺激素、促性腺激素释放激素(合成型及促性腺激素释放激素类似物)以及合成前列腺素($F_{2\alpha}$ 型或类似物)可用于调节雌性动物发情周期的不同阶段,合

成前列腺素还可用于引产。褪黑激素,一种在母绵羊耳后皮下植入的缓释制剂,用于刺激产生周期性的卵巢活动。孕激素类用于调节动物群体的动情期使之同步,或用于预

测动情期的开始。一旦除去孕激素供体（奶牛和母绵羊采用阴道内装置，母猪和母马则在饲料中混入），下垂体和下丘脑的负反馈效应将终止，从而引发动情期。通常采用皮下注射孕激素（甲孕酮、甲地孕酮、普罗孕酮）来抑制猫和犬的卵巢活动（动情期），而用烯丙孕素（混入饲料）抑制母马发情或协调小母猪和母猪同步发情。

莫能菌素，一种羧基离子载体抗生素，可以作为一种预混剂（供混入饲料）来预防艾美虫引起的肉鸡球虫病。对16周龄以上的火鸡、珍珠鸡和其他猎鸟不应使用含莫能菌素的饲料。莫能菌素可作为一种增产剂（提高饲料利用率和动物生长速率）用于肉牛和奶牛直至其首次产奶。应用于牛时，可以采用预混剂（钠盐），或者采用修饰释放瘤胃丸剂。不同动物口服莫能菌素的LD₅₀（mg/kg）存在差异：马，2~3；羊，12；猪，16；牛，22；鸡，200。必须特别注意的是，禁止给牛、猪、家禽或马施用莫能菌素，并避免意外污染饲料厂。甾体激素为促进生长剂（牛生长激素、猪生长激素、牛生长激素释放因子），在一些国家被作为增产剂，而另一些国家（欧盟成员国）则禁用。生长激素的性质和剂型研究已由Foster详细综述^[1]。将克仑特罗等 β_2 -肾上腺素受体激动剂用于肉牛增产是非法的。

一些用于治疗动物的植物或重金属中毒的解毒剂也可以归为兽用药，包括亚甲蓝、亚硝酸钠、硫代硫酸钠、钼酸铵和依地酸钙钠。维生素K₁用于治疗动物的华法令和香豆素的中毒，这些毒性物质存在于甜黄花草（*Anthoxanthum odoratum*）、腐烂的甜苜蓿干草（*Melilotus officinalis* and *M. alba*）、青储饲料中。乙酰半胱氨酸和抗坏血酸合用可以治疗猫的对乙酰氨基酚（扑热息痛）中毒。乙酰半胱氨酸可作为前体药物通过静脉注射补充谷胱甘肽，而抗坏血酸（静脉注射或口服）能降低高铁血红蛋白向血红蛋白的转化率。猫科动物的血红蛋白对氧化损伤（高铁血红蛋白症）尤其敏感。硫酸阿托品广泛用作动物的麻醉剂（马更适于用格隆溴胺），并可以高剂量（麻醉剂量的25~40倍，44g/kg）与乙酰胆碱酯酶再激活剂（碘解磷定）联合应用治疗有机磷酸盐中毒。

以上是关于兽药的应用以及兽医药理学和人体药理学起源差异的概要。

动物种属的分类

尽管各类哺乳动物的体征（尤其是体重）和行为不同，却拥有相同的机体系统，且各系统的生理功能相似。但是也有与物种相关的说明各物种唯一性的适应性。适应性的特点解释了将源自某些物种（实验动物）的科学信息推演至其他物种（家养动物）和人类的可能性。由于几种适应性的模式可采用数学方法描述，因此能就种间推演做一定预测。有关药物生物利用度和体内处置可信度的预测则取决于对目标物种的解剖学和生理学方的了解程度。

根据胃肠道的解剖特性可将家养动物广义地分为反刍类（牛、绵羊和山羊）和单胃类（马、猪、犬和猫）。考虑饮食习惯可进一步细化分类，也有助于解释药物吸收模式以及消化系统内共生微生物区系与药物之间可能发生的相互作用。反刍类属于草食动物，具有一个大容积的前胃隔室用于连续进行微生物发酵。马属于单胃草食动物，有一个小容量胃和一个用于微生物发酵的大容量结肠。猫和犬属于单胃肉食动物，而猪是可食草的单胃非偏食动物（与人类相似）。由于尿液pH主要取决于饮食成分，故一般草食动物的pH为7.2~8.4，肉食动物为5.5~7.0，而非偏食动物尿液pH可在较大的范围内变化（pH 4.5~8.2），通常猪偏碱性而人偏酸性。若有相当一部分（>20%）系统有效剂量经由肾排泄，则尿液pH将影响末端肾小管的重吸收程度和弱有机酸、碱的半衰期。

雌性动物生殖（发情）周期的特点因动物种类不同而异，主要表现在周期持续时间、发情期长度（性感受力）和排卵时间等方面（表2）^[2]。对于季节性饲养的物种（母马、母绵羊、母山羊和蜂王），发情时间受光照周期的影响显著。母马和蜂王在晚秋时节由于日照时间缩短而不发情，只有在早春季节日照时间渐长时才能再度发情。而母绵羊和母山羊的情况则正好相反。营养程度也会影响季节性饲养物种的发情。在家养物种中仅有中蜂王是由交配诱导排卵的。对生殖周期任何阶段的药理干预，无论是诱导母马、母绵羊或奶牛排卵，还是抑制母犬或蜂王发情或阻碍其卵子着床，都是基于改变生殖激素的血浆浓度进而影响特定过程的。为了成功地实施干预，必须了解血浆中各种激素水平的实时情况。

表2 家养动物生殖周期内不同阶段的平均持续时间

种类	动情周期持续时间	动情期持续时间	排卵期	受精卵进入子宫的时间（受孕后）	着床时间（受孕后）	妊娠类型	孕期
母马 ¹⁾	21d	5~6d	动情期的最后一天	3~4d	30~35d	上内皮绒毛膜	345d
母牛 ¹⁾	21d	18h	动情末期 12h	3~4d	30~35d	上内皮绒毛膜	280d
母绵羊 ¹⁾	17d	36h	动情初始后 30h	3~5d	15~18d	结缔绒毛膜	147d
母山羊 ¹⁾	20d	40h	动情初始后 30~36h	4d	20~25d	结缔绒毛膜	147d
大母猪	21d	45h	动情初始后 36~40h	3~4d	14~20d	上内皮绒毛膜	113d

续表

种类	动情周期 持续时间	动情期持 续时间	排卵期	受精卵进 入子宫的 时间(受孕后)	着床时间 (受孕后)	妊娠类型	孕期
母犬	动情期间隔 7~8个月, 视年龄而定	动情前期 9d, 动情期 7~9d	动情期的首日或次日	5~6d	15d	内皮绒毛膜	64d
蜂王 ¹⁾	16d(未成年者) (假孕持续 36d)	5~6d	交配后 24~32h 内诱发	4d	13d	内皮绒毛膜	65d

1) 季节性多发情。

(根据参考文献 [2] 修改)。

由于鸟类和哺乳动物存在较大差异,必须分别考虑这两类动物。“圈养”的鸟类包括鸡、火鸡、鸭、鹅、鸵鸟、珍珠鸡、鹌鹑和野鸡。家禽是指人工养殖的鸟类,通常包括鸡、火鸡、鸭和鹅,而其他圈养鸟类则称为猎鸟。统称家禽忽略了不同物种对剂量和组织内药物残留的要求不同,以及发生某些药物中毒的差异。

鸟类(爬行类)具有高度发达的肾门静脉系统,能从身体尾部汲排血液。因此,对这类动物经下肢(后肢)注射给药后,药物在进入大循环之前首先进入肾脏。这种血流入肾的特点使得水溶性离子药物可能发生首过排泄(如 β -内酰胺和氨基糖苷类抗生素)。

鱼类、爬行类(包括鳄鱼和美洲鳄)和两栖类都是冷血动物。与恒温动物相反,冷血动物体内的药物处置会受环境温度的影响。鱼类给药后的药物消除过程会随其生活环境的水温而变化,而用淡水还是海水取决于鱼的种类。鲑鱼的情况则更加复杂,因为成年鲑鱼生活在海水中却在淡水中产卵并孵育小鱼。

剂型和给药途经

剂型、给药途径和注射制剂的注射部位依动物种类或种群(如反刍动物或家禽)的不同而不同。差别最大的是口服剂型和外用制剂。在研制剂型之前,首先应该确定是应用于个体动物还是大量群体动物(兽群药物治疗),因为动物的主人在决定购买某种兽药之前会首先考虑给药的方便性和制剂成本。

1. 胃肠道吸收

胃肠道的解剖学特性和相关的消化生理功能决定着药物的吸收。对于猪、犬、猫和人类,给予口服溶液或传统(速释)剂型后,其血药浓度曲线通常很相似,均显示出一定形态的单峰。由于单胃物种之间胃排空速率存在差异,而小肠上端是主要吸收部位,因此不同物种血药浓度的达峰时间不同。与肠内容物 pH(平均 pH 6.6)不同,肠黏膜表面微环境的正常 pH 为 5.3,更适合弱有机酸碱类药物的吸收。正常条件下, $pK_a > 3.0$ 的弱酸和 $pK_a < 7.8$ 的弱碱在小肠部位的吸收良好^[3]。胃或小肠内容物 pH 的变化将明显改变弱有机电解质类(酸或碱)药物的解离程度。

当 pH 低于 pK_a 时,弱酸主要以结合型存在而易于吸收;弱碱的情况则相反。脂溶性中性分子(地高辛、氯霉素)和氟奎诺酮类(两性化合物)在犬体内易于吸收,但诺氟沙星的生物利用度远低于恩诺沙星、环丙沙星或麻保沙星。氨基糖苷类抗生素因其极性而在胃肠道吸收很差,用于治疗系统性细菌感染时必须注射给药。

口服缓释剂型以后,药物吸收的持续时间受到制剂在胃和小肠内总停留时间的限制。在犬体内约为 9~12h。研制用于犬类的缓释制剂,其目的是在给药间隔期间(12h)维持有效血药浓度并控制血药浓度的波动,而血药浓度的波动程度取决于药物半衰期和给药间隔时间^[4]。因此理想的候选药物应具备很高的口服生物利用度,以保证在胃肠道内的吸收良好,除生成活性代谢物外,多数药物仅被首过效应部分灭活,半衰期为 4~6h,效价相对较高,但应确保有效血药浓度范围足够宽。由于大多数脂溶性药物在犬和人体内的生物利用度和消除速率不同,适于制成缓释制剂的药物也不同。茶碱符合犬用口服缓释制剂的研制要求,在所有上市的缓释口服制剂产品中,无水茶碱片(200mg 和 300mg)最适于犬类。该产品的口服生物利用度(以茶碱计)为 76%,给药方案(每隔 12h 给予 20mg/kg)能将血药浓度稳定在有效治疗范围(6~16 μ g/mL)内,且茶碱浓度的峰谷波动小于其他缓释剂型^[5]。而传统剂型(氨茶碱片)的给药方案是每隔 8h 给予犬 10mg/kg。

其他以缓释口服剂型给药的兽用药物还有吗啡、普萘洛尔、奎尼定、维拉帕米、地尔硫草。其中,缓释硫酸吗啡(片剂,15mg)最适用于体重 10kg 以上的犬。推荐给药方案,每隔 8h 或 12h 给予 1~2mg/kg,可以有效缓解慢性疼痛^[6]。缓释剂型克服了传统口服吗啡制剂在犬体内药效维持时间短的缺点。苯妥英有可能成为缓释剂型的候选药物,可预防和治疗犬的全面性强直阵挛性发作(癫痫大发作)。苯妥英传统剂型的平均口服生物利用度为 36%,犬体内的半衰期为 3.5~4.5h(取决于给药剂量),有效血药浓度为 10~20 μ g/mL。而苯妥英在人体内的口服生物利用度为 90%,表观半衰期一般为 15~24h(具体取决于剂量)。苯妥英在人体内的消除较慢,故无需制成缓释剂型。

尽管马是单胃动物,其胃容量(约为胃肠道容积的 8.5%)相比猪(29%)和犬(62%)较小。马、猪和犬的胃容量以体积容量表示,分别为 7~14L、5.5~7L 和 3~

8L。与其他单胃动物的胃内容物平均 pH (pH 3~4) 相比, 马的胃内容物酸性较小 (pH 5.5, 变化范围 4.5~6.0), 其胃内壁的一部分实际由复层鳞状上皮组成。在自然放养条件下马是不断进食的。食物中的纤维组分主要在大肠内被消化, 但消化效率不如反刍动物高。在大肠内, 纤维性的碳水化合物经微生物发酵成为挥发性脂肪酸类, 而未消化的膳食蛋白降解为肽类和氨基酸。盲肠和结肠的总容量大约占整个消化道容积的 55%, 大肠内容物 pH 为 6.6~6.8。马的消化系统内两个彼此无关的特性分别是没有胆囊 (与驼和长颈鹿相似) 和不能呕吐。饲料和口服剂量之间的实时关系能够显著影响药物吸收特性。多数抗生素经口服 (糊剂) 或鼻饲管给予马以后, 其系统利用率会因给药前不久进食而显著降低。因此给予抗生素后应至少间隔 2h 方能饲食。各种口服保泰松制剂给予马时, 若同时进食则将改变非甾体抗炎药物的吸收模式但不影响其吸收程度^[7]。药物在马小肠内的吸收率, 尤其在同时进食或进食不久后给药的情况下, 可能因消化后的食物吸收 (干草尤甚) 而受到限制。此时, 吸收过程分为两个阶段, 起初 (给药后 1~2h) 是在小肠段, 几小时后 (8~10h) 膳食纤维类被微生物发酵, 药物主要经由大肠段吸收^[7,8]。如果因疏忽而使得马饲料中掺入了作为牛或猪的增产剂或生长促

进剂的饲料添加预混剂, 则可能使马中毒甚至死亡。反刍动物 (牛、绵羊和山羊) 的胃肠道解剖特性与单胃动物 (马、猪、犬和猫) 不同 (表 3), 它们在消化生理上的差异决定了各自适用的口服给药剂型, 并影响着药物的生物利用度。二者对摄入有毒植物的敏感性也不同。牛的成熟蜂巢胃容积是 100~225 L, 绵羊和山羊则是 10~25 L, 约占胃肠道容积的 60%。前胃的内容物呈流体或半固体块状, 富含重碳酸盐和磷酸盐而缺乏含淀粉酶的大量碱性唾液 (pH 8.2~8.4) 分泌物, 致使其 pH 范围在 5.5~6.5。除了缓冲作用之外, 唾液还具有消泡功能, 可防止食物膨胀。牛唾液的分泌量是每天 100~190 L, 而绵羊是每天 6~16 L, 这对于蜂巢胃内微生物发酵的持续进行至关重要。基于唾液流量和瘤胃液库容积的平均值, 推测蜂巢胃内流体的周转率牛为每日 2.0, 绵羊每天 1.1~2.2^[9]。尽管瘤胃壁的上皮层为复层鳞片状, 但其吸收容积却相当大^[10,11]。由于吸收以被动扩散的方式进行, 脂溶性药物, 无论中性分子还是弱有机酸碱的非离子形态, 都经瘤胃被吸收。图 1 以浓度比表示了 pK_a 值介于唾液 (pH 8.2)、瘤胃内容物和血浆 (pH 7.4) 之间的弱有机酸碱的理论平衡分布^[12]。

表 3 家养动物消化道各部分的相对容量

部位	相对容量/%			部位	相对容量/%	
	马	猪	犬		绵羊和山羊	
胃	8.5	29.2	62.3	瘤胃	52.9	
小肠	30.2	33.5	23.3	蜂巢胃	4.5	
盲肠	15.9	5.6	1.3	瓣胃	2.0	
大结肠	38.4	31.7	13.1	皱胃	7.5	
小结肠和直肠	7.0			小肠	20.4	
				盲肠	2.3	
				结肠和直肠	10.4	

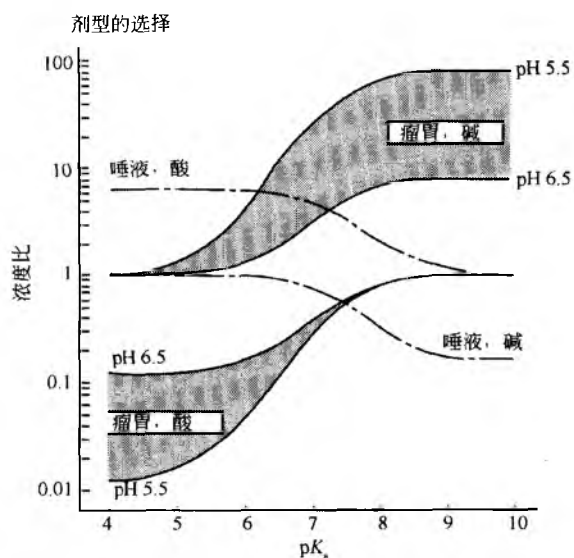


图 1 不同 pK_a 的酸碱在唾液、瘤胃、血浆的预期平衡分布。浓度为唾液或瘤胃浓度与血浆游离浓度的比, 酸碱分别计算, 假定血浆 pH 7.4^[12], 唾液 pH 8.2、瘤胃内容物 pH 5.5~6.5

瘤胃微生物至少能部分地使某些药物通过水解或分解反应被代谢 (如甲氧嘧啶、氯霉素、硝羟碘卜腓、洋地黄苷类), 从而减少了可供吸收的药物量。瘤胃内的生物转化致使反刍动物食用含氰苷 (氰中毒) 或沉积硝酸盐 (硝酸盐中毒) 的植物后更易中毒。滥用含氮肥料也可能导致硝酸盐中毒。静脉注射解毒物质可以治疗此类中毒, 如用硝酸钠和硫代硫酸钠治疗氰中毒、亚甲蓝治疗硝酸盐中毒。对于反刍动物, 由于化学物质可能在其前胃中微生物的作用下发生改变 (激活或解毒), 且机体整体生理节律主要取决于瘤胃运动, 因此如果不全面考虑基本饮食和饲养方案就无法进行药理学或毒理学的研究^[13]。

通过反复咀嚼和微生物消化之后, 蜂巢胃内容物中含混悬颗粒的流体组分被瓣胃 (前胃第三室) “泵”入皱胃 (真胃) 内。在两相转移的过程中, 水和电解质被吸收, 消化物中的粒子变小。成年牛的皱胃体积约占胃肠道容积的 4%~5%, 绵羊和山羊则为 7.5%。皱胃是瘤胃中唯一分泌消化液的隔室, 源自皱胃基底区的分泌物包括盐酸、胃蛋白酶, 哺乳类幼兽的瘤胃前端还分泌肾素 (一种凝乳酶)。

S

黏液则是由位于皱胃的柱形上皮细胞分泌的。皱胃内容物的 pH 变化不明显,通常接近 $3.0^{[14]}$ 。

由于蜂巢瘤胃的内容物体积很大,因此无论给药形式是溶液、混悬液或固体剂型,药物在其中的浓度均较低。在固体剂型溶出过程中,大量液体的稀释或与粒子物质的结合会降低药物的吸收速率,但未必会影响其吸收程度。脂溶性中性分子和弱有机电解质,尤其是有机酸的非离子形态,通常在蜂巢瘤胃中能够很好地被吸收。当给予奶牛阿司匹林 ($pK_a 3.5$) 固体剂型 (60g, 相当于 3.9g 口服丸剂) 时,水杨酸盐被缓慢吸收,其系统利用度为 50%~70%^[15]。对于成年牛,12h 的给药间隔是根据吸收速率而非水杨酸盐的半衰期 (0.8h) 制定的。

苯并咪唑类驱虫剂 (阿苯达唑、吩苯达唑、奥吩达唑即阿苯达唑亚砒)、原阿苯达唑类 (奈托比胺、非班太尔可分别代谢转化为阿苯达唑和吩苯达唑) 和水杨酸苯胺杀虫剂 (氯氰碘柳胺、碘醚柳胺、氯羟柳胺) 可以口服混悬液形式给予反刍动物。驱虫剂的口服混悬液比口服溶液在延缓药物吸收、延长药效持续时间方面更有优势。减少进食量 (给药前 36h 和给药后 36h) 能降低含悬浮物质的瘤胃液从蜂巢瘤胃向皱胃和小肠的迁移速度,且延长了药物溶出和吸收的时间。当瘤胃液的迁移速度因暂时性降低进食量而减小时,奥吩达唑在绵羊体内的系统利用度升高^[16]。而碘醚柳胺和三氯苯达唑以口服混悬液形式给药后,在饲食干草的圈养羊羔体内的系统利用度大于草场放养的羊羔^[17]。膳食方案或成分对杀虫剂系统利用度的影响可以归因于药物溶出和吸收时间的变化。

网状沟的闭合能使口服溶液从瘤胃的贲门绕过瘤胃而直接流入皱胃。某些动物的网状沟能反射性地自发闭合,当然化学诱导也能在一定程度上产生闭合。为使药物 (如非甾体抗炎药物) 在胃肠道内被迅速吸收,可在诱导网状沟闭合后立即口服该药物的溶液。牛口服重碳酸钠溶液、绵羊口服硫酸铜溶液或静脉注射一剂赖氨酸加压素,均能诱导网状沟闭合。但口服药物溶液 (如二甲硅油乳剂或泊洛沙林) 用于治疗牛的多泡性胀气时则应避免网状沟闭合。对于幼年反刍动物,由吮乳诱发的网状沟反射性闭合可使乳液直接流入皱胃。

利用反刍动物前胃的解剖特性,缓释瘤胃丸剂给药之后将会长时间滞留在蜂巢瘤胃内。含微量元素 (氧化钴、氧化铜、钴和铜的磷酸钠结晶骨架物、硒酸钠形式的硒) 的缓释瘤胃大丸已有上市产品,供牛或绵羊用。复合瘤胃大丸可用于圈养的成年鹿。利用一种特殊的释药装置可将某些驱虫剂 (伊维菌素、吩苯达唑、奥吩达唑、摩朗得) 或增产剂 (莫能菌素) 制成控释瘤胃大丸,供口服给予特定体重范围内 (100~400kg) 的肉牛。设计这种药物系统的目的在于长时间 (通常 120~140d) 持续释放药物进入瘤胃液中,或者按照预定的时间间隔 (约 3 周) 间歇地脉冲释药 (奥吩达唑丸剂)。该时间间隔常与牛胃肠道内主要微生物三线虫类的潜伏期一致^[18]。目前已有能持续释放伊维

菌素、吩苯达唑或摩朗得进入瘤胃液的控释瘤胃大丸供肉牛给药,以及在 100d 内释放阿苯达唑或伊维菌素的控释大丸供绵羊 (体重 35~65kg) 给药。给药系统至少在整个释药期间都滞留在瘤胃内。人用口服控释给药系统的滞留性能受胃排空时间的限制,最长只能达到 12h^[19]。

2. 首过效应

穿过胃肠道黏膜屏障的药物分子随肝门血液转运进入肝脏,在肝脏中经历首过效应之后方能进入系统循环。所有动物种类均存在首过效应,由于草食动物通常具有较大的肝容量,可通过微粒体氧化反应代谢脂溶性药物,因而比非草食动物 (犬、猫、猪、人) 能更大幅度地降低药物的系统利用度。对于反刍动物 (牛、绵羊、山羊) 和马类 (马、小型马、驴),以口服混悬液形式给予的三氯苯达唑在肝内经首过代谢生成三氯苯达唑亚砒 (活性代谢物),进而转化为砒类 (非活性) 代谢物。对于多数动物种类,首过效应实际上降低了口服脂溶性药物 (如安定、心得安、维拉帕米) 的系统利用度,这类药物通常在肝脏内经历一系列的生物转化。尽管系统前 (首过) 代谢主要发生在肝脏,但在药物吸收过程中小肠黏膜也能发生代谢。表 4 列举了一些经犬口服后显示出不完全系统利用度的药物。肝脏的系统前代谢是导致绝大多数药物系统利用不完全的原因。将地高辛溶于醇溶液以明胶胶囊形式给予人口服后,其生物利用度高于片剂,尽管片剂的溶出速率更高^[20~22]。同样地,通过比较药-时曲线下面积,犬服用氟灭酸软胶囊后的生物利用度相对高于硬胶囊,平均高出 34%^[23]。以上两实例中,口服药物生物利用度的提高应归因于软胶囊内辅料的理化因素。处方或剂型对马口服外消旋酮洛芬 (2.2mg/kg) 系统利用度的影响如下:消旋酮洛芬微粉以硬胶囊给予马并同时限制进食时, S (+)-和 R (-)-对映体的系统利用度分别为 54.2% 和 50.5%,而同批次的酮洛芬粉末以油性基质糊剂给药后的系统利用度分别为 5.75% 和 2.7% (忽略饲食方案的影响)^[24]。为避免肝首过代谢的影响,硝酸甘油被设计成多种剂型,包括人用的注射液、舌下喷雾、缓释片、透皮给药系统以及犬 (心源性肺水肿) 或马 (急性蹄炎) 用的外用软膏。舌下给药途经避免了首过效应,但不易给予动物固体剂型。

首过效应是导致口服后在肝内发生一系列代谢活动的药物的系统利用度存在种间差异的主要原因,而另一个重要的原因在于瘤胃微生物的代谢作用。一些药物 (硝羟碘苄腈、氯霉素、洋地黄苷类) 在瘤胃内被代谢,致使临床应用时只能采用注射给药方式。

相比口服给药,直肠给予脂溶性药物可以在某种程度上避免首过效应的影响。犬类避免首过效应影响的能力低于人类。与人和犬不同,马直肠的静脉输出实际上是肝门静脉相连的,因此从直肠吸收的药物很少能避免首过效应。

表 4 某些口服药物在犬体内的系统利用度

药物 (剂型)	剂量/(mg/kg)	系统利用度/%	代谢部位/其他因素
苯巴比妥 (片剂)	10	86~96	肝
丙戊酸 (片剂)	40	78	肝
苯妥英 (片剂)	15	36 ¹⁾	肝
水杨酸盐 (阿司匹林片)	共 250mg	45	肝
布洛芬 (明胶胶囊)	5	60~86	肝
萘普生 ²⁾ (明胶胶囊)	5	68~100	—
茶碱 (传统氨茶碱片)	10	91	肝
安定 (片剂)	2	13~86 ³⁾	肝 + (肠黏液)
利多卡因 (溶液)	10	15	肝
普鲁卡因 (片剂)	25	85 ^{1),4)}	—
心得安 (传统片剂)	共 80mg	2~17	肝
维拉帕米	0.5	15	肝
地高辛 (Lanoxin 片)	共 1mg	80	溶出
头孢羟氨单水化合物 (胶囊)	20	57	溶出
诺氟沙星 (片剂)	5	35 ¹⁾	溶出 + 肝
恩诺沙星 (片剂)	5	100 ⁵⁾	—
别嘌呤醇 (片剂)	15	70 ⁶⁾	肠道 + 肝 (黄嘌呤氧化酶)

1) 平均口服生物利用度; 犬个体差异大。

2) 萘普生在犬体内的半衰期很长。

3) 总有效苯二氮䓬类。

4) 犬体内不生成 N-乙酰普鲁卡因胺 (活性代谢产物)。

5) 总的抗微生物活性氟奎诺酮。

6) 马体内的平均口服生物利用度为 14%。

3. 口服剂型

口服给药途经比注射途经安全, 能够避免注射部位产生组织刺激。但口服药物的系统利用度在动物种内和种间均有很大差异。口服给药是否便利取决于动物种类和药物剂型。为了方便给药, 并兼顾不同动物种类消化系统的解剖学、生理学特性以及平均体重, 每种动物对口服剂型都有不同的要求。必须考虑给药总剂量大小和药物在该种动物体内的口服生物利用度。

可供兽用的口服剂型包括口服溶液、流体、混悬液、凝胶、糊剂、胶囊、片剂、瘤胃丸剂、添加在饲料中的散剂和颗粒、添加在饮水或鱼池中的可溶性散剂, 以及加入家畜或家禽饲料中的预混剂。选择剂型要考虑药物的溶解度和理化性质、用药动物种类以及是否需要快速起效或延长药效。液体剂型 (口服溶液和流体) 所含的药物易于吸收, 对于单胃动物尤其如此。口服流体, 如二甲硅油乳剂和泊洛沙林 (非离子表面活性剂) 可用于治疗牛的多泡性胀气。一种含丙二醇 (葡萄糖前体) 的口服流体加入饮水或制成口服溶液后可用于治疗牛羊酮病。水性混悬液可经鼻饲管给予马、经口 (灌服) 给予反刍动物、经口 (有时借助口服注射器) 给予犬和猫。口服糊剂和凝胶属于半固体剂型, 由主人利用专门设计、方便给药的预灌注定量注射器给予马。糊剂的处方必须满足以下几个要求: 在较大的环境温度范围内都必须易于注射给药, 强度适宜以便于

黏附在舌上, 无味或气味适宜 (马比较喜欢薄荷或苹果味)。能够制成口服糊剂或凝胶给予马的药物类型包括驱虫剂、非甾体抗炎药以及某些抗生素。将适当剂量的驱虫药物糊剂涂抹于猫的前肢末梢处, 可替代口服片剂或胶囊是一种方便的给药方式。固体剂型必须在胃中经过崩解和溶出过程后药物方能被吸收。与口服溶液相比, 药物从固体剂型中的释放降代了其吸收速率。关于固体剂型的质量方面, 胶囊内活性组分的粒子大小和分布几乎不受胶囊填充工艺的影响, 在这一点上胶囊优于片剂, 因为片剂在制备过程中经受了物理压力 (压缩和加热)。此外, 同一活性成分的胶囊比传统片剂的溶出速度快。包衣小丸或颗粒填入胶囊后的释药行为比压成片剂更易于推测。但同种药物的胶囊剂通常比片剂价格高, 由于生产成本较高, 只有当填充物为流体或药物的生物利用度至关重要时软胶囊才比硬胶囊更适宜。封装后的活性成分在释放之前都受到保护, 从而避免被瘤胃微生物代谢或在瘤胃内发生化学降解。昆虫生长抑制剂 (如二氟隆) 或昆虫生长调节剂 (如烯虫酯) 可用于牛, 这些物质能干扰在牛粪内繁殖的节肢动物寄生虫类的变形和生殖。二氯松是一种具有杀胃肠道线虫 (包括鞭虫 *Trichuris* spp.) 活性的有机磷化合物, 可将其纳入聚氯乙烯树脂小丸 (塑化) 混入饲料中喂猪或制成犬用罐头食品。这种剂型保护二氯松免于被水解并能够在胃肠道内缓慢释药, 从而大大提高了药物的安全限度。

缓释剂型要求初始释药剂量足以达到所需的治疗浓度

并在其后较长时间内持续恒速（零级）释药。药物的安全限度是必须考虑的重要因素，因为缓释剂型中含有大量药物，一旦“突释”可能会导致中毒。对于半衰期为 4~6h 的药物，其缓释剂型的给药间隔可以是 12h（犬）或 24h（马）。很少有缓释制剂能同时适用于两种动物。这类剂型必须完整无损地吞咽服用。

设计控释瘤胃大丸的目的在于维持一定时期内恒速持续释药（驱虫剂或增产剂）或按照预期间隔间歇地脉冲（常分 5 次）释药。这类产品都有专门为一定体重范围的牛或羊设计的不同品种。口服控释系统在蜂巢瘤胃内的滞留时间有赖于系统的密度或性状。设计用于体重 100~400kg 牛的伊维菌素瘤胃丸剂（Ivomec），其中所含的 1.72g 伊维菌素在 135d 内以恒速（每天 12.5mg）持续释放进入瘤胃液内。这种丸剂外观为圆柱形，其外层为半透衣膜，内层包裹物一端是金属密度成分，另一端是渗透压能供体，中间是含药处方。渗透压能供体由含聚合物-盐类混合物的片剂组成，透过半透衣膜吸收水分后导致片剂膨胀，进而推动伊维菌素蜡质处方通过质密成分的出口（通道）释放出来 [图 2(a)]^[25]。吩苯达唑瘤胃丸剂（Panacur）用于体重 100~300kg 的牛，其中含有 12g 驱虫剂，能在 140d 内持续释放进入瘤胃液内。通过两个镁合金管的溶蚀控制吩苯达唑的释放，每管含 5 粒致密的圆柱形片剂（6g 吩苯达唑）。镁合金管外层一系列密实的刚性塑料环将其与胃内容物隔离，中央的环连接两管。这种丸剂能够完全被生物降解而在前胃内无残留^[26]。摩朗得酒石酸盐瘤胃丸剂（Paratect Flex）用于体重大于 100kg 的牛，其含有 11.8g 摩朗得。该丸剂由含药聚合物填充于圆柱形的三层柱芯内构成。药物扩散透过半透膜释放进入瘤胃液中（每天约 150mg），至少持续 90d。在服用摩朗得酒石酸盐丸剂过程中不能停药，因为该药物的吸收差且存在首过代谢，致使其系统利用率非常低。Captac 又称 Laby^[27]，该装置是一种控释瘤胃胶囊，设计用于特定体重范围的羊，能够在 100d 内持续释放内含的驱虫剂阿苯达唑（每天 32.5mg）或伊维菌素（每天 1.6mg）。该装置由顶端具弹簧活塞、底部有小孔（一系列穿孔）的聚丙烯筒组成 [图 2(b)]。筒顶部的一对聚丙烯折翼被水溶性绑带固定在折叠位（外形扁平），使之能够口服给药。筒内装有含驱虫剂阿苯达唑（3.85g）或伊维菌素（160mg）的片剂。瘤胃胶囊给药后，固定折翼的绑带溶解，折翼打开至预定角度（外形展开）以防反刍或越过蜂巢重瓣口而流失。释药速率受多种因素影响，包括片剂处方、释药小孔直径、活塞施加在片剂上的压力。片剂中的药物可以从瘤胃液淹没装置的释药小孔溶出。

调节释放瘤胃丸用于体重 200~400kg 的牛，能够在 105d 内每隔 3 周脉冲释药一次（1.25g）^[18]。含 5 粒小片的丸剂（Autoworm 5）在给药后第 21 天初次释药，而含 6 粒片剂者（Autoworm 6）则在给药当天即释药。

散剂或预混颗粒中的药物可以混入猪饲料中，这种给药方法的缺点是摄取的药物剂量不明确，种内口服生物利用度存在差异。因此给予的药物必须具有较大的安全范围

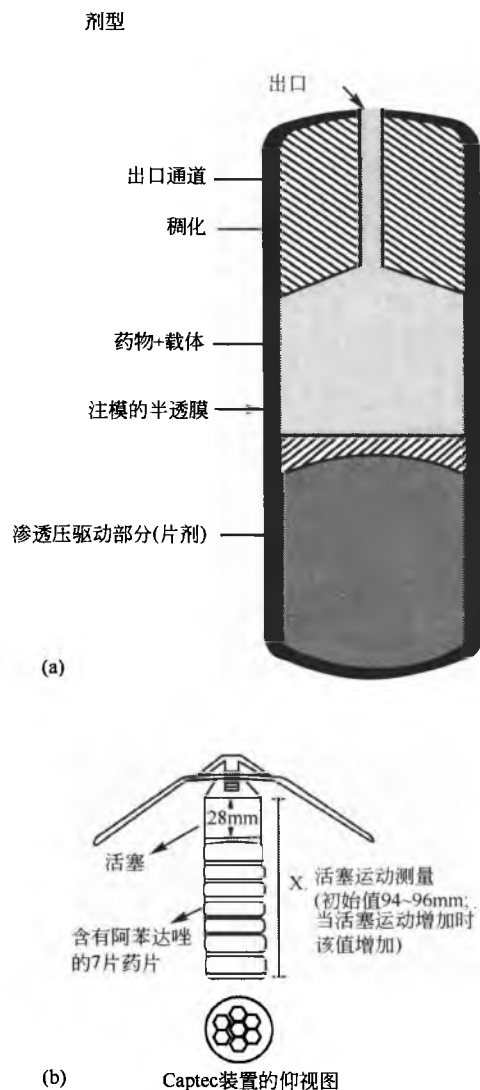


图 2 (a) IVOMEC 示意图; (b) Cattec 示意图

且口味适宜，最重要的是动物必须愿意摄食，但患病动物通常食欲不振。混入饲料常被认为是一种最好的饲料调味方法，而对于马却是一种不可靠的给药方式。但当待给药的动物数量很少时，将单剂量散剂或颗粒装入小袋则是一种方便的给药方法。由于不同物种对剂量水平（mg/kg）的要求不同，而且家养动物种类的平均体重变化幅度较大，因此单剂量袋剂必须根据不同动物种类单独制备。将可溶性盐类药物制成的溶液剂或散剂可添加在饮水内给予家禽和其他家养鸟类，或是加入已知水容量的给药池内。含各种微量元素（钴、铜、碘、硒）的袋剂由药剂师加入饮水中用于矫正牛的矿物缺乏症。每袋的矿物应可供 25 头牛服用 7d。Klink 等已经对设计预混处方时必须考虑的因素进行了详细阐述^[28]，此外还要保证其能够与大量饲料混合均匀。预混剂必须稀释至预期剂量水平，用于动物时一般以百万分之一（ppm）计（g/t 饲料或 mg/L 水）。

4. 肌肉注射

肌肉注射是常用的动物给药途径。这种途径易于实施,且相当一部分兽用注射剂都属于长效剂型,可以单次给药或者长时间分次给药,因此比较方便。但在选择这种途径给药之前必须考虑以下几个因素:给药目的、适宜的给药间隔时间和期望起效时间、已有注射制剂用于特定动物种类的适宜性、食用动物的停药时间,以及预期疗程所需的制剂成本等。对于特定动物种类来说,注射制剂的适用性主要取决于制剂的处方。重要的处方变量包括处方中的药物浓度(这决定着注射体积),载体和其他组分的性质,以及注射部位产生刺激的可能性。马在各类家养动物中对注射部位刺激的耐受性最差,而且以油类作为载体的药物决不能注射给马。

制剂处方决定了药物的吸收方式并影响着药物的系统利用度,而沉积在肌肉内的制剂容量以及注射部位的血管分布则决定着药物的吸收速率。吸收屏障是微血管内皮,多数药物以被动扩散方式通过,但水溶性小分子可能经由内皮细胞膜上的细胞间“孔道”大量流入微血管。微血管内皮上的水通道(孔道)直径约为肠内皮的十分之一(40~80Å)。氨基苷类抗生素等极性药物可在肌肉注射部位被迅速而完全地吸收,但在胃肠道内因内皮细胞膜很致密而吸收极差。药物在肌肉注射部位的吸收通常被认为属于一级过程,但这种推测不完全正确,尤其是药物吸收的初期可能符合零级(非线性)动力学。影响吸收速率的局部和全身因素在整个吸收过程中是不断变化的。当注射部位流向骨骼肌的血液增加的能够促进吸收,但当给予局部血管收缩性药物或疾病状态下骨骼肌灌注减少时则吸收被延缓。注射制剂在肌肉群(肌肉)或脂肪组织中的药物处置,以及对组织的刺激性或药物沉积在注射部位而产生的异常吸收,均能反映在血药浓度曲线上。

肌肉注射的部位能影响血药浓度曲线和药物的生物利用度,尤其是给予长效制剂时。吸收方式的变化可归因于骨骼肌血流灌注方式的不同以及有效吸收表面积的区域差异。对于牛和羊,在颈侧比在臀部(半腱肌)和腿部(股四头肌)进行肌肉注射、或是在颈侧皮下注射的吸收更迅速。对于猪,给予肌肉注射制剂时总是在颈侧部位,该部位比其他部位的吸收更佳、注射部位的药物残留较少、能避免污染畜体。对于犬和猫,最好以四头肌群作为肌肉注射部位并缓慢注射。在马的不同肌肉注射部位以及肺部顶端皮下注射给予普鲁卡因青霉素G(20 000IU/kg),当长效制剂在颈部(颈巨肌)注射时,青霉素G的血药浓度峰值和系统利用度最高,其他注射部位依次降低:二头肌>胸肌>臀肌或皮下(图3)^[29]。肌肉注射须确保不会无意间注射进入静脉。

肌肉注射潜在的缺点包括制剂在脂肪组织或肌间筋膜平面的沉积以及注射部位残余药物产生的组织损伤^[30~32]。组织损伤一般由处方其他组分而非药物本身所致。评价肌

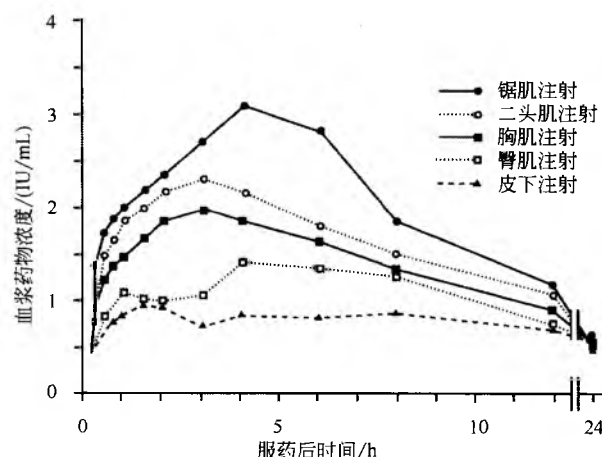


图3 5只动物(4匹马和1匹矮马)不同部位注射20 000IU的普鲁卡因青霉素的平均血浆青霉素浓度-时间曲线^[29]

内注射部位组织刺激程度和缓解速率的有效活体检查方法包括:对紧邻注射部位的肌肉组织进行回声深度检测,监控血浆内肌酸激酶的活性^[34,35]。能用于活体动物是这些方法的主要优势。若出现明显中度至严重的组织损伤,损伤程度和损伤实质特性可通过尸检进行描述。某些组织损伤性的注射制剂无可避免地会应用在食用动物上,因而必须考虑其损伤消除的时间。药物的消除时间随剂型(制剂)处方变化而变化,因而必须按照推荐的途径给药,且给药方法因动物种类而异。鱼类属于冷血动物,药物消除速率受其基本代谢速率的影响显著,而代谢速率则随环境温度的变化而异。用于养殖鱼类的药物(主要混入饲料或水内)的消除时间以“温度日数”计算,其数值随环境温度改变而改变。

对于猫、小犬和小猪,在采用腿部肌肉注射方法给药时应特别注意注射制剂所含的药物浓度,以免损伤坐骨神经。由于鸟类和爬行动物具有高度发达的肾门静脉系统,因此当在鸟类腿部或爬行动物尾部进行肌肉注射时,首过肾消除效应可能会降低以肾消除为主的药物(如 β -内酰胺和氨基苷类抗生素)的系统利用度。

5. 皮下注射

皮下注射是替代肌肉注射给予家养动物注射制剂的一种方法。这种给药途径常用于犬和猫,偶尔用于马。影响药物从骨骼肌吸收的主要因素也同样适用于皮下注射。这些因素包括注射制剂含药浓度、处方基质和其他组分的性质、给药总容积、皮下组织的血液供给和吸收表面积、组织刺激性、药物在注射部位的沉积以及药物残留情况。皮下部位的药物吸收通常比肌肉部位更为缓慢且不确定,因为皮下组织的血流量有限且变化较大。但其吸收面积更大,并可能通过按摩注射部位的皮肤得到进一步扩大。对于某些注射制剂,采用皮下注射产生的组织刺激程度似乎比肌肉注射更严重^[36,37]。但由于皮下注射部位周围的受损组织

能从尸体上去除,因而肉中残余药物的可能性较小。皮下注射对于一些难溶性混悬液是一种更适宜的给药途径。在设计缓释注射制剂的处方时,需要在释药速率和制剂的组织刺激程度之间寻找一个平衡点。已研发成功的多种用于皮下植入的修饰释放装置,可作为注射缓释油性混悬液的替代方法。例如,用于阉牛和阉羊、能在7d内给予生长激素释放因子的植入用渗透泵^[38];能够以接近零级速率释放雌二醇的扩散聚合骨架系统;修饰释放褪黑素植入剂可用于母羊,以加快其周期性卵巢活动的发生。尽管已在牛、羊用修饰释放皮下植入装置的研发方面花费了很大精力,但过去十年内将植入剂用于食用动物仍未得到广泛接受。

6. 静脉注射

静脉注射药物溶液时,一般假设系统利用度为100%。这种假设忽略了静脉注射药物在分布至全身之前必须经过肺脏这一生物转化器官的事实。静脉注射起效迅速,并克服了伴随其他给药途径的吸收差异。对于刺激性太大而无法采用其他途径注射给药的注射剂(包括长效制剂),均可能谨慎地通过静脉注射给药,但必须确保不会发生血管周围泄漏,防止肌肉注射刺激性溶液可能导致的血栓静脉炎。一旦药物进入系统循环,其从体内的去除就完全依赖于消除过程(生物转化和排泄)。描述药物处置(分布和消除)的药动学参数均基于单次静脉注射给药后的血药浓度曲线。通过比较非静脉和静脉给药后药时曲线下总面积,能够预测药物的绝对生物利用度,此时必须假设静脉给药剂量可以全部为系统所用而且药物的清除不受给药途径的影响。

不同动物种类用于静脉注射给药的静脉管不同。马、牛、绵羊和山羊采用颈静脉,而犬和猫可采用头(常用)或颈静脉,猪则常用耳静脉。对于麻醉后的犬和猫,颈静脉便于补充静脉麻醉剂,而犬舌下静脉可用于紧急情况下注射少量药物溶液。研究药物生物利用度和处置的药动学特征,可以从除猪以外所有动物的颈静脉采集血样,且常用前腔静脉。对采集血样的静脉管(除了注射药物的静脉管以外)的选择一般不会影响长时间检测血药浓度进行药动学研究所得的结果。

出于实践操作的考虑,静脉灌注在动物中的应用远不及人类广泛。静脉注射,尤其是恒速灌注,与其他给药途径相比有两个重要优势:药物能完全为系统所用且药效强度(大小)更具可控性。给动物采用静脉注射的主要缺点是多次给药的时间间隔相对较短。用于养殖动物的注射剂型大多属于静脉注射用长效制剂。

当给予新生仔(小于7d龄)某些抗菌素(氨比西林或阿莫西林、头孢噻肟的钠盐,硫酸庆大霉素或阿米卡星)时,骨内给药是一种替代静脉注射的可行方法。这种方法尤其适用于处在感染性休克或脱水期、或二者兼有的患败血病的新生仔。阿米卡星骨内和静脉注射给予新生仔后的血药浓度曲线近似(图4)^[39]。

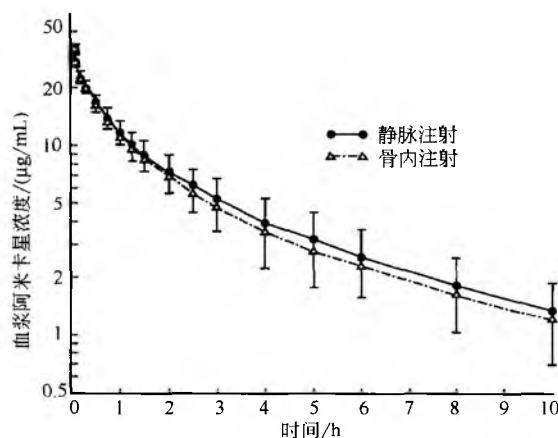


图4 6只驹(出生后3~5d)静注和骨注硫酸阿米卡星(7mg/kg)后的药时曲线

7. 注射剂型

用于动物的注射剂型包括注射用的水溶液、水性有机和油性溶液、乳剂、水性或油性混悬液,以及皮下注射用修饰释放装置。注射制剂必须无菌、无热原,液体处方应尽可能地调整至接近生理pH且最好与体液等张。各类注射剂型的优缺点另有详述^[40]。

非静脉注射制剂的处方是决定血药浓度曲线的主要因素,只有当药物以水溶液形式给药且不在注射部位沉积或产生组织刺激时方能被立即吸收。肌肉注射给予马、犬和猫硫酸庆大霉素(50mg/mL的水溶液)后,药物迅速被完全吸收并在30~60min内达到血药浓度峰值,其系统利用度超过90%。分别给犬静脉、肌肉和皮下注射庆大霉素(3mg/kg),后两种方式获得的血药浓度峰值(10.7μg/mL i.v.; 10.2μg/mL s.c.)和绝对生物利用度(96% i.v.; 94.3% s.c.)相近^[41]。分别给犬皮下注射3个水平(5mg/kg、10mg/kg和20mg/kg)的硫酸阿米卡星(50mg/mL水溶液),结果发现,反映吸收程度的药时曲线下面积与给药剂量呈正比^[42]。给羊肌肉注射每公斤体重剂量1.1mg的头孢噻唑游离酸和2.2mg的头孢噻唑钠(稀释的水溶液),头孢噻唑及其代谢物的血药浓度峰值(C_{max})分别为4.33μg/mL和7.13μg/mL(以HPLC测定脱乙酰甲酰头孢噻唑乙酰胺计),表观半衰期分别为6.5h和7.65h,药时曲线下面积(从零点到含量测定的定量限度)与给药剂量呈正比^[43]。药物在肌肉注射部位迅速($t_{max}=0.5\sim1h$)而完全地被吸收。盐酸氯胺酮(100mg/mL水溶液)在猫的肌肉注射部位被迅速吸收,但在产生麻醉效应之前疼痛是很明显的。对于马、犬和猫,给予氯胺酮之前预先给予 α_2 -肾上腺素受体激动剂(地托米丁、米狄托米丁或胺噻嗪)使之镇静。具有刺激性的注射液(硫喷妥钠、替卡西林钠-克拉维酸钾复合物、头孢唑辛酯、头孢噻肟、头孢曲松、氟尼辛葡甲胺)和地高辛注射液只能通过静脉注射给药。含有微溶药物和与水混溶溶剂如丙二醇的处方可能会导致

药物在肌内注射部位发生沉积,因此这类制剂(如安定、苯妥英)不适于肌内注射。安定注射剂(5mg/mL溶液或乳剂)可以通过静脉注射给予犬和猫,适当稀释后可以静脉灌注给药。

对于含药物的难溶性盐类的注射制剂,药物的吸收程度通常取决于其溶出速率而非吸收过程本身,进而限制了吸收速率、血药浓度峰值以及维持有效血药浓度的时间。长效注射制剂多含有非水溶剂(如油类)或难溶性盐类(通常为水混悬液)。由于药物是逐渐或分段被吸收利用的,故这类制剂在较长时间内发生缓慢的药物吸收^[44]。埃维菌素类和美比霉素类(大环内酯类)属于高度亲脂性物质,由此可以预见其在体内脂肪丰富处的分布和沉积程度,其注射剂型(供牛或羊皮下注射,但不用于马)的处方影响着单剂量给药(200 μ g/kg)的血药浓度曲线。各类上市产品的处方不同,伊维菌素是非水制剂(60%丙二醇/40%甘油),道拉菌素是含芝麻油和油酸乙酯(90/10)的油性制剂,莫西菌素是水溶液。表5列出了这类抗寄生虫药皮下

(肩部)注射给予10月龄赫里福肉牛以后药物吸收和消除速率的药动学参数^[45]。由于该研究没有确定药物的系统利用度(F),因此采用了消除率和系统利用度比值(CL_B/F)。比较三种市售土霉素注射剂(一种传统制剂、两种长效制剂)在猪后颈部肌内注射给药后的参数,三者的血药浓度峰值(C_{max})、达峰时间(t_{max})和平均滞留时间(MRT)均有显著差异,但曲线下面积(AUC)无明显差异(表6)^[46]。结果表明,传统制剂的给药间隔应为24h,而长效制剂则为48h。对于猪、反刍犊牛、肉牛、羊、赤鹿(*Cervus elaphus*)、黇鹿(*Dama dama*)和骆驼(*Camelus dromedarius*),单剂量肌内注射(20mg/kg)土霉素长效制剂后的血药浓度能持续48h高于0.5 μ g/mL。但市售长效土霉素制剂不能用于马类(马、小型马和驴)。根据临床疗效确定抗菌素的注射制剂时,最有效的方法是比较其推荐给药剂间隔期间的抑菌浓度-时间曲线下面积(AUC/MIC_{90}),因为该参数表明了易感微生物暴露在药物中的程度。

表5 10月龄赫里福肉牛(体重180~210kg)单剂量(200 μ g/kg)皮下(肩部)注射伊维菌素(IVM)、道拉菌素(DRM)和莫西菌素(MXD)市售制剂后的吸收和消除速率的药动学参数

动力学参数	IVM	DRM	MXD
$C_{max}/(\mu\text{g/mL})$	42.8 \pm 3.8	37.5 \pm 3.9	39.4 \pm 3.4
t_{max}/d	4.00 \pm 3.94 ¹⁾	6.00 \pm 1.35	0.32 \pm 0.03 ³⁾
$t_{1/2}/\text{d}$	17.2 \pm 4.26 ²⁾	6.25 \pm 0.16	14.5 \pm 1.20 ³⁾
$CL_B/f/[\text{mL}/(\text{d}\cdot\text{kg})]$	457 \pm 52.5 ¹⁾	322 \pm 164	938 \pm 62.5 ³⁾

1) IVM的平均药动学参数与MXD存在显著差异($P<0.05$)。

2) IVM的平均药动学参数与DRM存在显著差异($P<0.05$)。

3) MXD的平均药动学参数与DRM(c)存在显著差异($P<0.05$)。

结果均表示为平均值 \pm 标准误差($n=4$)。

表6 在猪($n=8$)后颈部单次肌内注射给予每公斤体重20mg剂量的三种土霉素处方后的吸收和处置的药动学参数

动力学参数	产品A	产品B	产品C
$C_{max}/(\mu\text{g/mL})$	6.27 \pm 1.47	5.77 \pm 1.0	4.68 \pm 0.61
t_{max}/h	3.0(2.0~4.0)	0.5(0.083~2.0)	0.5(0.083~2.0)
$AUC/(\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL})$	79.22 \pm 25.02	91.53 \pm 20.84	86.64 \pm 14.21
MRT/h	11.48 \pm 2.01	25.27 \pm 9.22	37.66 \pm 15.62
$C_{p(24h)}/(\mu\text{g/mL})$	0.81 \pm 0.34	1.01 \pm 0.26	0.97 \pm 0.29
$C_{p(48h)}/(\mu\text{g/mL})$	<LOQ	0.40 \pm 0.17	0.50 \pm 0.09

注: LOQ = 定量限(0.1 μ g/mL)。

产品A, 含10%Engemycine的聚维酮。

产品B, 含20%Oxyter LA的二甲基乙酰胺。

产品C, 含20%土霉素LA的吡咯烷酮和聚维酮。

结果表示为平均值 \pm 标准偏差。

同一药物的不同注射制剂肌内注射后血药浓度曲线变化很大,甚至采用相同的注射部位也是如此。在反刍犊牛的后颈部肌内注射等剂量水平(7.7 \pm 1.0mg/kg)的五种不同的氨苄西林注射制剂,比较所得的血药浓度曲线,可

发现不同制剂间存在差异(图5)^[47]。考察每种制剂相对于参比制剂的生物利用度非常有用,但必须采用交叉设计并设置适宜的洗净期。

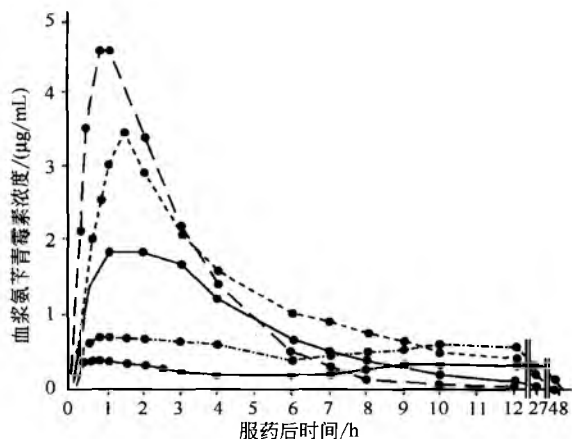


图5 5只驹肌内注射相同剂量 ($7.7 \pm 1.0 \text{ mg/kg}$) 的不同的氨苄青霉素注射液后的平均血浆药物浓度^[47]

注射用混悬液中的药物浓度会影响血药浓度曲线。在相同注射部位给马肌内注射相等剂量 (10 mg/kg) 的浓度不同的阿莫西林 (100 mg/mL 、 200 mg/mL) 的三水阿莫西林水性混悬液后, 低浓度制剂 (10%) 的吸收较好且血药浓度曲线更稳定。在猪颈部 (耳后 10 cm 处) 肌内注射三水阿莫西林 (15% 分散在混合油性基质中) 后产生两个吸收峰, 注射后 1.3 h 、 6.6 h 的浓度分别为 $1.7 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.8 \mu\text{g/mL}$, 而其单一油性基质的等浓度制剂的血药浓度曲线仅有一个吸收峰, 且药物的平均滞留时间比前者延长了 $1/8$ ^[48]。血药浓度曲线上的两个吸收峰可能是由于油性基质混合物释放阿莫西林的速率不同所致。

犊牛的年龄和体重 (45 kg 、 55 kg 、 62 kg) 影响肌内注射三水阿莫西林 (10% 水性混悬液) 后阿莫西林的系统利用度。当给不同动物肌内注射相同的阿莫西林制剂时, 小型动物 (小猪、犬、猫) 较快达到血药浓度峰值随后急剧下降, 而大型动物 (牛、马) 则在至少 8 h 内显示出较低且相对稳定的血药浓度 (图 6)^[49]。

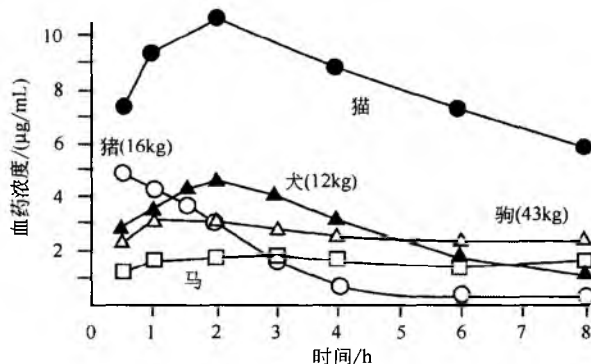


图6 不同动物肌内注射氨苄青霉素三水合物混悬液 (100 mg/mL), 剂量为 7 mg/kg , 猫为 $10 \sim 12 \text{ mg/kg}$, 图示动物种类和体重对药物生物利用度的影响

牛乳腺

抗菌素类以及其他药物, 主要以被动扩散方式透过血液-母乳屏障, 而后者虽为解剖学屏障, 但更像一个限制功能性屏障。非极性脂溶性化合物和具有充分脂溶性的极性物质均能被被动扩散通过类脂性的血液-母乳屏障^[50]。当泌乳水平适中时, 循环通过乳腺的血液流量与泌乳量的比值大致为 $670:1$, 这就使药物有充足的机会从系统循环被动扩散进入乳液。各种奶牛的牛乳中组分含量 (g/dL) 不同, 蛋白质为 3.1 (Holstein) ~ 3.9 (Jersey、Zebu 和 buffalo), 脂肪为 3.5 (Holstein) ~ 5.5 (Jersey、Zebu 和 buffalo)。

药物 (非离子与离子型之和) 的血-乳平衡浓度比值取决于药物解离程度, 而后者又取决于血浆和乳汁的 pK_a/pH 、离子型药物的电荷、药物与血浆蛋白和乳汁大分子的结合程度。只有血浆中脂溶性、弱有机酸碱的游离 (未与蛋白质结合) 非离子型部分才能扩散通过细胞屏障进入乳汁^[51]。对于正常的泌乳奶牛 (乳汁 pH $6.5 \sim 6.8$), 含有弱有机酸的乳汁超滤液对血浆超滤液的平衡浓度比值小于 1 。而含土霉素、利福平这类中、高程度脂溶性的两性药物的平衡浓度比值分别为 0.75 和接近 1 。弱有机碱, 除了氨基苷类、奇霉素和多黏菌素 B (脂溶性差的药物) 之外, 其浓度比值均大于 1 (表 7)^[52]。亲脂性有机碱类 (大环内酯类、林可酰胺类、甲氧苄啶) 的高浓度比值是由于其在酸性乳汁中存在离子捕集效应。恩诺沙星及其经 N -去乙基生成 (肝脏内一种微粒介导的氧化反应) 的代谢产物环丙沙星, 可望在乳汁内达到足以对抗革兰氏阴性需氧菌, 尤其是大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 感染的有效浓度。

患有乳腺炎时乳汁 pH 增大到 $6.9 \sim 7.2$, 致使脂溶性有机碱的离子捕集效应减弱, 而弱有机酸的浓度有少许升高。较大的乳汁 pH 不会影响两性药物 (氟奎诺酮类、四环素、利福平) 的浓度, 但这类药物在乳汁内的抗菌活性常低于在细胞外液或体外测定的结果。

抗菌疗法通常用于治疗哺乳期的临床乳腺炎以及哺乳末期的亚临床乳腺炎, 而采取预防措施是降低奶牛群乳腺炎感染发病率的关键。临床乳腺炎的常见致病微生物包括乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*)、大肠菌 (大肠埃希菌 *Escherichia coli*, 克雷伯菌 *Klebsiella* spp.)、金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、停乳链球菌 (*S. dysgalactiae*) 和无乳链球菌 (*S. agalactiae*)。常见的治疗方法有注射抗生素制剂进行全身治疗, 或应用速释乳内制剂进行局部治疗。单纯通过乳头沟灌注给予乳内制剂的方法不足以治疗中度至重度感染, 因为灌注药物无法满足部分闭合乳腺以及感染乳腺 (尤其是大肠菌乳腺炎) 频繁挤奶的要求。对于早期诊断的轻度乳腺炎感染, 仅灌注速释乳内制剂即可, 而无需同时进行全身治疗。哺乳末期 (末次挤奶之后) 给予缓释乳内制剂可治疗亚临床乳腺炎并预防新感染的发生, 包括非哺乳期 (干乳期) 由化脓放线菌所致的夏季乳腺炎。由于金黄色葡萄球菌是亚临床乳腺炎的主要致病微生物, 所选用的缓释乳内制剂应具备对抗所有菌株的抗菌作用。

表 7 平衡条件下抗生素药物在乳汁：血浆中的浓度比值的计算值和测定值

药物	脂溶性	pK _a	乳汁 pH	浓度比值（超滤乳汁：超滤血浆）	
				理论值	测定值
酸类					
青霉素 G	低	2.7	6.8	0.25	0.13~0.26
邻氯青霉素	低	2.7	6.8	0.25	0.25~0.30
氨苄青霉素	低	2.7, 7.2	6.8		0.24~0.30
头孢噻啶	低	3.4	6.8	0.25	0.24~0.28
头孢来星	低	4.9	6.8	0.25	0.33
磺胺二甲氧嘧啶	中	6.0	6.6	0.20	0.23
磺胺嘧啶	中	6.4	6.6	0.23	0.21
磺胺二甲基氧嘧啶	中	7.4	6.6	0.58	0.59
利福平 ¹⁾	中/高	7.9	6.8	0.82	0.90~1.28
碱类					
泰乐菌素	高	7.1	6.8	2.00	3.5
林可霉素	高	7.6	6.8	2.83	3.1
螺旋霉素	高	8.2	6.8	3.57	4.6
红霉素	极高	8.8	6.8	3.87	8.7
甲氧苄啶	高	7.3	6.8	2.32	2.9
氨基苷类	低	7.8 ²⁾	6.8	3.13	0.5
大观霉素	低	8.8	6.8	3.87	0.6
多黏菌素 B	极低	10.0	6.8	3.97	0.3
两性类					
两性土霉素	中	—	6.5~6.8	—	0.75
强力霉素	中/高	—	6.5~6.8	—	1.53

1) 利福平是一种两性药物。理论浓度比值按照其有机酸型计算。
2) 所示的氨基苷类 pK_a 值不确定。

1. 注射制剂

一个用于全身性治疗牛乳腺炎的“理想”抗菌剂应具备以下特点^[53]：

- (1) 对大多数乳腺炎致病微生物的最小抑菌浓度 (MIC) 值低。
- (2) 肌内注射后的系统利用度高。
- (3) 脂溶性，在血液中以非离子型为主，血浆蛋白结合率低。
- (4) 表观半衰期长，以确保在推荐的给药间隔期（12h 最佳）内注射部位的乳腺内药物浓度高于（最好是数倍于）其 MIC。
- (5) 有效剂量下对牛的副作用最小。
- (6) （从乳汁和畜体中的）消除期短。

注射制剂的抗菌活性取决于致病微生物，药动学特性符合以上标准的制剂包括青霉素 G（水性混悬液）、三水阿莫西林-克拉维酸钾复合物（水性混悬液）和恩诺沙星（溶液）。恩诺沙星尚未被证实可用于为人类供乳的奶牛。为了使乳腺内药物达到有效浓度，盐酸土霉素（传统制剂）必须通过缓慢的静脉注射给药。尽管大环内酯类抗生素可在乳汁内达到很高浓度，但其也能在离子捕集效应作用下扩散进入瘤胃液（pH 5.5~6.5）。目前来看，缓慢静脉注射

是最佳的给药方法，因为现有的注射制剂可能导致肌内注射部位的组织刺激。由于螺旋霉素极易与组织成分结合，因此应用后表现出很长的消除期。

2. 乳内制剂

乳内制剂的处方应能快速释放抗菌素或在较长时期内缓慢释放抗菌素。要求所有乳内制剂均不刺激乳房软组织（上皮组织）。速释制剂主要用于治疗哺乳期奶牛的临床乳腺炎，并连同全身治疗，其消除期应较短。所用基质和处方的黏度应允许快速释放抗菌素，同时确保在推荐的给药间隔期内维持有效浓度。释放的抗菌素能否进入感染部位取决于其在乳腺组织中的摄取和分布情况，而后者则取决于药物的化学本质和理化性质（尤其是脂溶性）。与乳汁蛋白质或乳腺组织成分的结合限制了药物的分布，并延长了消除期。抗菌素通过血流和穿过血-乳屏障的双向被动扩散从乳房内的非患区向患区迁移。制成混悬液且推荐给药剂间隔为 12h 的乳内制剂包括邻氯青霉素钠、氨苄西林钠-邻氯青霉素钠复合物、甲氧苄啶-磺胺嘧啶复合物、盐酸土霉素（油性混悬液），而红霉素则被制成乳房内溶液剂。头孢呋辛钠和头孢哌酮钠（第三代头孢类抗生素）被分别制成油性糊剂和油性混悬液。速释乳内制剂的消除期较短，通常 7d 后即可宰杀，3.5d 后即可挤奶，某些制剂的消除期甚至更短。

缓释乳内制剂可在哺乳末期（末次挤奶后）灌注给药，或者给予非哺乳期奶牛乳头沟灌注治疗亚临床乳腺炎并预防非哺乳期新感染的发生。可以选用抗菌素的难溶性盐类或者是释药速率相对恒定、接近零级的制剂处方。整个释药期间，抗菌素必须在乳房内维持活性（稳定），且制剂不会产生组织刺激性。由于缓释制剂不用于哺乳期奶牛，因此抗菌素与乳房组织成分的结合没有引起特别关注。但是对于慢性葡萄球菌性乳腺炎来说，由于致病菌通常驻留在上皮细胞、中性粒细胞和巨噬细胞内，因而考察药物透过细胞膜的能力尤为重要^[54]。缓释乳内制剂产品包括苜蓿芽青霉素和单硬脂酸铝的混悬液，三水氨苄西林、苜蓿芽青霉素和单硬脂酸铝的混悬液或不含单硬脂酸铝的油性混悬液处方，普鲁卡因青霉素 G 油性糊剂，硫酸二氢链霉素和普鲁卡因青霉素 G 油性糊剂。青霉素类尤其是氨基苷类穿透细胞膜的能力有限，而氟奎诺酮类、利福平和四环素类则较强。

含一种或多种抗菌素以及一种皮质甾醇（氢化可的松或氢化泼尼松）的复方制剂已有上市产品，可供哺乳期奶牛乳房内灌注用。人们期望在减低乳腺炎发病率的同时也能避免免疫抑制效应以及由糖皮质激素类固醇所致的嗜菌功能下降。三水阿莫西林-克拉维酸钾和氢化泼尼松联合应用就是复方制剂（油性混悬液）的实例之一，能够以 12h 间隔进行乳房内灌注给药，且消除期很短（畜体需要 7d，乳液需要 2d）。与糖皮质激素类固醇不同，非甾体抗炎药物不会引起免疫抑制。以 24h 为给药间隔静脉注射氟尼辛葡甲胺盐（2.2mg/kg）可治疗由大肠埃希菌（内毒素）所致的急性乳腺炎。药物的解热、抗炎和止痛效应的强度主要取决于炎症过程中介入治疗的阶段。早期诊断并以氟尼辛及时治疗将大大提高药物的治疗效果。氟尼辛在牛体内的半衰期是 8.1h，且消除期很短（畜体需要 7d，乳液需要 12h）。氟尼辛不会影响合用抗菌素的药效，因此应该同时采用抗菌素治疗。没有证据表明对患大肠菌性乳腺炎的牛实施全身性抗菌素治疗会导致内毒素的大量释放。对感染部位频繁地挤奶以除去细菌和细胞残骸对于大肠菌性乳腺炎的治疗非常重要，也许是最关键的一步^[55]。缓慢静脉注射 5~10U 的催产素稀溶液（10U/mL），有利于将奶完全排出。

治疗浓度

对于动物和人体，产生主要治疗效应所需的血药浓度大致相同（表 8）。药物的作用机制对于不同的哺乳动物来说似乎是一致的。给药方案的计量是基于治疗浓度范围以及描述生物利用度和药物处置的药动学参数确定的。只有在静脉给药时才假设药物全部为机体系统所用。特定给药途径的药物制剂给药方案存在种间差异，这通常但并非总是由药物的药动学特征存在种间差异所致。对特定药物（吗啡、二甲苯胺噻嗪）的易感性（所需剂量）也存在种间差异，这可能是药效动力学变化〔亲和性和（或）有效性〕的结果。

表 8 一些药物的主要药理效应和治疗血药浓度范围

药物	药理效应	治疗浓度
奎尼丁	抗心率失常	2~6μg/mL
普鲁卡因胺	抗心率失常	6~14μg/mL
利多卡因	抗心率失常	1.5~5.0μg/mL
心得安	抗高血压	20~80ng/mL
地高辛	正性肌力	0.6~2.4ng/mL
苯巴比妥	抗痉挛	10~25μg/mL
哌替啶	止痛	0.4~0.7μg/mL
茶碱	支气管扩张	6~16μg/mL

驱虫剂的剂量，一般指单次给药剂量，是在适当情况下基于对临床疗效的半定量评价而确定的。在驱虫剂剂型研发过程中以及为不同动物种类选择给药途径时，还必须考虑活性部分的生物利用度和血药浓度曲线^[56]。由于反刍动物（牛、绵羊和山羊）、猪、马以及小型动物（犬和猫）所采用的驱虫剂给药剂型不同，目前已有大量上市制剂可供各种动物应用。

药物处置

药物处置的种间差异可能是由药物分布程度和（或）消除速率不同所致的。这种差异存在于反刍动物和单胃动物、或是食草动物和非食草动物之间，主要取决于哺乳动物的分类系统。恒温动物和变温动物之间的药物消除速率差异也很大。关于变温动物（鱼类和爬行动物）体内的药物处置所知甚少。

1. 分布程度

药物，尤其是脂溶性有机碱类的分布范围在反刍和单胃动物间常存在显著差异。注射给药后，亲脂性碱类从系统循环被动扩散进入瘤胃液（pH 5.5~6.5）中，并在那里因离子化而被“捕集”。这些药物被缓慢重吸收，若暴露出适于水解或降解代谢的功能基团，可能被瘤胃内的微生物部分灭活。考察稳态分布容积 $[V_{d(ss)}]$ 有利于确定在疾病状态下或由于血浆蛋白的结合置换而引起的药物分布程度的改变是否显著，也有利于比较同一物种新生动物和成年动物体内的药物分布程度。与 $V_{d(area)}$ 不同，稳态分布容积至少在理论上与药物消除速率的变化无关^[57]。

2. 血浆蛋白结合

虽然各种家养动物之间的药物-血浆蛋白结合程度不同，但种属的结合范围相对狭小，且这种差异没有显著的临床意义。酸性药物结合的种间差异是因为血浆白蛋白的构象不同。鸟类血浆白蛋白浓度低于哺乳动物，因此酸性药物在鸟体内的结合率较低。



3. 消除过程

家养动物的肝脏占体重的 1.25%~2.5%，肝动脉血流占心脏输出总量的 26%~29%。肝门静脉对肝脏血流尚有额外贡献。肾脏占体重的 0.25%~0.6%并接收心脏输出量的 22%~24%。对于鸟类和爬行类，肾门静脉系统将血液输送至肾脏。按器官质量比例来说，肾的血液灌注比肝更丰富。肝脏通过多种途径代谢药物、其他外来化学成分（外源性化合物）和一些内源性物质（如类固醇激素、胆红素）。这些途径包括由肝脏微粒介导的氧化反应、还原和水解反应（Ⅰ相）以及与各种内源性物质的结合（合成）反应（Ⅱ相）^[58,59]。Ⅰ相代谢反应普遍存在，其性质在哺乳动物、鸟类和鱼类中相同，但种间代谢速率的差异很大且无法预测。尽管分子结构是发生Ⅰ相反应的决定性因素，但发生微粒体氧化反应仍要求物质呈适宜的脂溶性。Ⅱ相代谢反应的情况则不同，在一些物种内不完全或者根本不发生Ⅱ相代谢，由此可以对最终代谢途径进行一定的预测（表 9）^[50]。Ⅱ相反应发生要求在药物分子（母体药物或Ⅰ相代谢产物）中有适合结合反应的功能基团、内源性反应

物质（结合剂）和转化酶。主要的转化酶为尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶、硫转移酶、N-乙酰转移酶、谷胱甘肽硫转移酶和甲基转移酶。药物结合物的极性、脂溶性较弱，且在血管外的分布范围比母体药物或Ⅱ相代谢产物小，其中绝大多数无药理活性。除少数特例（如多数磺胺类的 N⁴-乙酰基衍生物）外，药物结合物的水溶性远远大于母体药物。葡萄糖苷结合物尤其易于经尿或胆汁或两者发生载体介导的主动排泄。所形成的结合物存在种间差异，源于结合剂存在能力、形成“激活态”核酸的能力以及转化酶的活性具有种间差异^[60]。鱼类形成“激活态”核酸尿苷二磷酸葡萄糖醛酸的能力较差，所以限制了葡糖苷酸的合成。前体药物属于另一类药物，其本身并无活性，但经Ⅰ相代谢转化，通常是水解反应之后成为活性母体药物。口服应用的前体药物包括恩纳普利（依那普利拉）、匹氨锡林（氨苄西林）、萘托比胺（阿苯达唑）和非班太尔（吩苯达唑）。这些前体药物的代谢转化（活化）发生在进入系统循环之前，由瘤胃内微生物引起或在通过肠黏膜或肝脏（首过效应）时发生。

表 9 家养动物在某些结合反应方面的缺陷^[50]

物种	结合反应	主要目标基团	合成反应状况
猫	葡萄糖苷合成	-OH, -COOH, -NH ₂ , -NH-, -SH	有，慢速
犬	乙酰化	Ar-NH ₂	无
猪	硫酸盐结合	Ar-OH, Ar-NH ₂	有，程度低

瘤胃内微生物至少能通过水解或降解反应部分地灭活口服药物（氯霉素、甲氧苄氨嘧啶、硝羟碘苄腈、地高辛）。反刍动物能够自我消除含氰苷植物（如李 *Prunus* spp.、相思树 *Acacia* spp.、糖桉树 *Eucalyptus cladocalyx*）所致的毒性是因为苷类在瘤胃内被水解并释放出氢氰酸。含葡萄糖苷酸酶的肠内微生物能够再次激活（通过水解）由胆汁分泌的葡萄糖苷酸结合物。肾排泄是消除血浆中多数离子化药物、极性药物和药物代谢产物的主要方式。药物与血浆蛋白的广泛结合（>80%）限制了肾小球的滤过，但不会阻碍由载体介导的活性肾小管分泌。尽管药物可以通过肾小球滤过和肾近端小管的分泌进入肾小管液中，但当远端肾单位发生重吸收时，肾清除率仍会降低。由于重吸收是通过被动扩散进行的，它受远端肾小管液中药物的浓度和离子化程度以及肾小球滤液通过远端肾单位速率的影响。离子化程度取决于药物 pK_a 和尿液 pH。肉食动物的尿液通常呈酸性（pH 5.5~7.0），而草食动物则呈碱性（pH 7.2~8.4）。弱有机酸的消除在碱性尿液内被加强，而在酸性尿液内则被减弱；弱有机碱则相反。肾消除药物（青霉素类、大部分头孢菌素类、氨基糖苷类、多数利尿剂、非去极化神经肌肉阻断剂）的速率存在种间差异，主要源于肾小球滤过速率（GRF）种间各不相同。以菊粉的清除为例，其 GRF 平均值 [mL/(min×kg)] 在犬体内是

3.96、猫为 2.94、猪为 2.80，山羊、牛、绵羊则分别是 2.26、2.25、2.20，马为 1.65，在人体内的预测值为 1.84mL/min×kg。尿液 pH 能够影响脂溶性适中且经肝脏代谢和肾消除的药物（安非他明、甲氧苄氨嘧啶、苯巴比妥、磺胺类）的消除速率。

家养动物肝细胞分泌胆汁的速率是每天 12~24mL/kg，猫和犬属于该范围低端，马（没有胆囊）属于高端。排泄至胆汁中的化合物相对分子质量多大于 300 并具有一定的极性，因而能够借助载体介导过程从肝实质细胞进入胆汁。药物及其胆汁中的代谢产物（主要是结合物）进入十二指肠，其中的某些药物（取决于其脂溶性）在十二指肠内可经被动扩散被重吸收。

4. 消除速率

半衰期是用来衡量药物消除总速率的药动学参数。大部分主要经肝发生生物转化的药物的半衰期都存在明显的种间差异（表 10）。一般规律是，药物在牛和马（食草动物）体内的半衰期比在猫和犬（肉食动物）中短，而少数药物在人体内的半衰期比在家养动物体内长。但也有例外，如甲基黄嘌呤（咖啡因和茶碱）在马体内以及保泰松在牛体内的半衰期则较长。与马、犬和人不同，保泰松在牛体内的半衰期为 42~66h，且似乎与剂量无关。由于不同物种

的肝消除速率的不同(生物转化推知),各种药物(磺胺二甲嘧啶、甲氧苄啶、头孢噻夫/脱呋喃甲酰头孢噻夫、氯氟碘柳胺、氯舒隆)的半衰期在山羊(尤其侏儒羊)体内比

在绵羊体内短,而一些药物(保泰松、氟哌酸)的半衰期在驴体内比在马和小型马体内短。

表 10 一些主要通过肝代谢消除的药物半衰期的种间差异

药物	牛	马	犬	人
苯巴比妥	0.8	1.5	4.5	22.3
硫喷妥	3.3	2.5	8.3	11.5
水杨酸盐	0.8	1.0	8.6	12.0
保泰松	42~66	4.1~4.7 ¹⁾	2.5~6.0 ¹⁾	72.0 ¹⁾
氟胺烟酸	6.9	1.9	3.7	-
吗啡	—	1.0	0.95	1.9
氯胺酮	0.9	0.7	1.0	2.5
咖啡因	3.8	18.2	4.25	4.9
胆茶碱	6.9	14.8	5.7	9.0
氟哌酸	2.4	6.4	3.6	5.0
恩氟沙星	1.7	5.0	3.4	—
氯霉素	3.6	0.9	4.2	4.6
甲硝唑	2.8	3.9	4.5	8.5
甲氧苄氨嘧啶 ²⁾	1.25	3.2	4.6	10.6
磺胺嘧啶 ²⁾	2.5	3.6	5.6	9.9
磺胺间二甲氧嘧啶 ²⁾	12.5	11.3	13.2	40

1) 半衰期有剂量依赖性。

2) 半衰期可能受尿液 pH 影响。

苯妥英、丙戊酸盐、卡马西平和氯硝西泮在犬体内的半衰期比在人体内短得多(表 11),满足抗犬惊厥效应的给药间隔却仍不能用于人的治疗^[61]。苯巴比妥和蔡普生在杂种犬体内的半衰期在是纯种犬中的 2 倍。蔡普生在犬体内具有较长的半衰期(杂种犬 74h,纯种犬 35h),这在非甾体抗炎药中是不常见的。蔡普生的半衰期在人体内是 13.9h,马为 8.3h,小型猪为 4.8h,恒河猴为 1.9h。

表 11 比较单次静脉注射(卡马西平除外)给予犬和人抗癫痫药物后的平均半衰期(h)

药物	犬	人	治疗血药浓度范围/($\mu\text{g/mL}$)
苯巴比妥	64	96	10~25
苯妥英	3.5~4.5 ¹⁾	15~24 ¹⁾	10~20
丙戊酸钠	2	14	40~100
卡马西平	1.5	15	4~10
氯硝西泮	1.5~2.5 ¹⁾	24~36 ¹⁾	0.01~0.08
地西泮	7.6 ²⁾	32.9 ²⁾	>0.15

1) 半衰期有剂量依赖性。

2) 母体药物和活性代谢产物。

主要由葡萄糖苷酸结合作用消除的水杨酸的半衰期,在

猫体内是 25~35h 并与剂量相关,而在人体内是 10~15h,犬是 8.6h,马是 1h,牛是 0.8h。肝脏微粒体的葡萄糖醛转移酶活动相对较低是猫科动物的特征,不仅适用于家养猫(*Felis catus*),还适用于狮子(*Panthera leo*)、非洲灵猫(*Viverracivetta*)、小斑獾(*Genetta pardina*)^[62]。尽管犬和狐狸(犬科动物)无法完成芳香族氢的乙酰化(ArNH_2)和氨基团上氢的乙酰化(RNHNH_2 或 ArNHNH_2),但是缺少这种代谢途径并不会延缓具有某些功能基团(磺胺类药物、普鲁卡因胺)的药物的消除,大部分可能会以母体药物的形式经尿液被排出,或者有另一种替代代谢途径来弥补乙酰化氨基的缺失。

家养物种体内的氨基酸结合物常以甘氨酸作为内源性反应物质。甘氨酸结合发生在家养动物的肝脏和肾脏中,而犬仅在肾中发生。存在于线粒体中的转化酶是酰基辅酶 A 甘氨酸转化酶。在雁形目(鸭、鹅)和鸡形目(雏鸡、火鸡)等鸟类体内则由鸟氨酸取代甘氨酸作为结合剂,但鸽形目(鸽子、斑鸠)的情况则不同。

尽管各种代谢途径都不可避免地存在例外情况,但绝大多数在肝脏发生广泛生物转化的药物在实验动物(小鼠、大鼠、豚鼠、兔)和恒河猴体内的半衰期比在家养动物和人体内短。如安替比林,它可作为标示物用于指示肝脏微粒体的氧化活性,其半衰期在实验动物(0.2~1.4h)和恒河猴(1.2h)体内比在家养动物(1.75~3.25h)体内短,在人(10.3~12.7h)体内则更短。有人认为^[63],人类的

肝脏微粒体氧化代谢药物的能力较弱与其长寿有关。根据脑重和体重的公式,人类的寿命潜能估计是93岁,马是39岁,犬是20岁,猫是14岁,相比之下非洲象则是77岁。

与哺乳动物相比,主要经肝脏生物转化的药物的半衰期在鸟类中存在很大差异^[64]。抗菌素的半衰期在变温动物(鱼和爬行动物)体内较长,这与其代谢速率很低相吻合^[65],并受环境(对于鱼类指水)温度的影响(表12)。药物消除速率随环境温度升高而增加(或半衰期减小)的程度在各种鱼中也存在差异。

表12 一些抗生素在不同鱼类体内的半衰期

抗生素	鱼种类	环境温度/℃	半衰期/h
甲氧苄氨嘧啶	鲤	10	40.7
	(<i>Cyprinus carpio</i> L.)	24	20.0
磺胺嘧啶	鲤	10	47.0
	(<i>Cyprinus carpio</i> L.)	24	33.0
磺胺二甲嘧啶	鲤	10	50.3
	(<i>Cyprinus carpio</i> L.)	20	25.6
	虹鳟	10	20.6
	(<i>Salmo gairdneri</i>)	20	14.7
环丙沙星	虹鳟	12	11.2
	(<i>Salmo gairdneri</i>)		
	鲤	20	14.5
	(<i>Cyprinus carpio</i> L.)		
	非洲鲶鱼	25	14.2
	(<i>Clarias gariepinus</i>)		
氟苯尼考	大西洋鲑	10.8±1.5(海水)	12.2
	(<i>Salmo salar</i>)		
土霉素	虹鳟	12	89.5
	(<i>Salmo gairdneri</i>)		
	非洲鲶鱼	25	80.3
	(<i>Clarias gariepinus</i>)		
庆大霉素	斑点叉尾鲷	22	12.0
	(<i>Ictalurus punctatus</i>)		

关于肾中药物半衰期种间差异的报道比肝脏中脂溶性药物的半衰期报道少。庆大霉素只能通过肾小球滤过才能被消除,其半衰期在实验动物体内是0.5~1h,在家养动物体内是1.25~2.5h,人体是2.75h,各种鸟类体内则是1.25~3.4h,22℃环境下斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)体内是12h。对于哺乳动物,庆大霉素的半衰期反应了肾小球滤过的相对(而非实际)速率,且与尿液pH无关。庆大霉素在各物种体内的分布容积相近(250~300mL/kg)。

经历高度肠肝循环的药物的半衰期在物种间的差异也很大,其中在鱼类体内相对较长。土霉素的半衰期在25℃环境下在非洲鲶鱼(胡鲶 *gariepinus*)体内是80.3h,在12℃环境下虹鳟(*Salmo gairdneri*)体内是85h^[66],相比之下其在人体内的半衰期是9h,在家养动物体内是3.4~9.6h,在家兔体内是7.3h。分布程度和肠肝循环程度等变量共同导致了地高辛半衰期在物种间的变化,其范围从人体内的7.8h到猫体内的35h。

5. 清除

由血液浓度测得丙泊酚在人(31mL/min·kg)和犬(59mL/min·kg)体内的系统清除率超过了肝血流量(人和犬分别为每千克体重24mL/min和42mL/min)。由此可知,尚有其他器官(肺)或肝外组织也参与了丙泊酚的消除(代谢)。犬和人清醒时丙泊酚的血液浓度相同(1mg/mL)。

当应用传统(速释)氨茶碱片剂时,要保证达到10μg/mL的稳态血浆茶碱浓度并产生持续的支气管扩张效应,给药速率对于犬是每隔8h给药10mg/kg,对于马或猫是每隔12h给药5mg/kg。茶碱在犬体内的系统清除率(100mL/h·kg)是在马(40mL/h·kg)和猫体内的2.5倍,而不同物种对该药物口服剂型的系统利用度却相似(90%~100%)。

6. 种间类推

进行哺乳动物种间类推,首先假设生理学变量和生化过程与体重相关。在描述药物消除的种间异速生长量度时,使用清除率这一以生理学为基础的参数可能比半衰期(混合参数)更合适。采用药动学参数-动物体重的双对数图来检验异速生长关系是否为线性。对于某些动物,不同消除途径且结构无关的药物的系统清除率与个体体重与高度相关(表13)。菊粉(标识物)和庆大霉素通过肾小球滤过消除,氨苄西林通过肾小球滤过和肾近端小管分泌消除,而土霉素经肠肝循环并最终由肾小球滤过缓慢消除。恩氟沙星、茶碱和安替比林不易被肝所捕集,这意味着它们的清除率可能受血液中未结合部分和肝脏代谢能力的影响,并且由肝脏的I相代谢消除。恩氟沙星和茶碱主要经由微粒体介导的氧化反应消除,而安替比林(标识物)完全经由微粒体氧化消除。安替比林清除率的种间类推证明了人是非协调性的物种,与所研究的其他10个物种相比,人的微粒体氧化能力较低。由于物种间血浆蛋白的结合能力不同,应用非结合药物的肝实际清除率比用系统清除率能够更好地代表异速生长量度的修正。该方法已经用于安替比林^[67]和茶碱^[68]的种间类推,另外还能校正人类的寿命潜能^[63]。由于经历广泛I相肝代谢而被肝脏高度捕集的药物清除率主要取决于单一的生理学变量(肝血流量),种间异速生长量度应该可以用于这类药物。所选用的药物消除指数取决于所需修正的水平。

表13 某些药物在不同哺乳动物体内的清除率(mL/min)与体重(kg)之间的异速生长关系

药物	消除过程	物种数目	异速生长		相关系数
			系数	指数	
菊糖	E(r)	8 ¹⁾	4.13	0.86	0.989
庆大霉素	E(r)	8 ¹⁾	2.60	0.86	0.970
氨苄西林	E(r)	8 ²⁾	5.47	0.94	0.959
土霉素	E(r)	8 ³⁾	7.96	0.73	0.978

续表

药物	消除过程	物种数目	异速生长		相关系数
			系数	指数	
恩氟沙星	M (h)	8 ⁴⁾	12.53	0.93	0.984
胆茶碱	M (h)	9 ⁵⁾	1.98	0.83	0.978
安替比林	M (h)	10 ⁶⁾	8.16	0.85	0.989

1) 猫、犬、山羊、绵羊、猪、人、牛、马。

2) 兔、犬、绵羊、猪、人、驴、牛、马。

3) 兔、猫、山羊、绵羊、猪、驴、牛、马。

4) 兔、猫、犬、绵羊、猪、骆驼、马、母牛。

5) 大鼠、荷兰猪、兔、猫、犬、猪、人、牛、马。

6) 小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猴、犬、山羊、绵羊、猪、牛 (人是非协调物种)。

每种药物的显著性水平是 $P < 0.001$ 。

考虑到器官 (肝、肾、心) 质量、生理学变量 (肝血流量、肾功能、心输出量、基础耗氧量) 以及药动学参数 (系统清除率和分布容积), 异速生长指数的数值通常为 0.67~1; 若考虑生理周期 (心跳时间、呼吸周期)、更新时间 (血清白蛋白、总体液、血液循环) 以及药物半衰期, 则异速生长指数常接近 0.25, 分别代表了哺乳动物的能量消耗^[69] 和内源性过程^[63] 的更新时间。

以药物处置的种间异速生长量度为基础的预测, 其可信度有赖于应用灵敏精确的分析方法测定血液或血浆中药物 (及活性代谢产物) 的含量, 掌握药物的主要消除过程, 研究至少 4 种体重范围较大的动物 (根据体重比值的对数), 以及非协调物种的鉴定 (以便了解任何可能存在的例外情况)。由于每个物种都有其独特性, 应用该技术进行预测仅局限于药物研发的临床前阶段。

7. 立体异构的意义

立体异构在剂型处方设计以及确定外消旋物的活性程度和处置方面具有一定意义, 因为机体内存在手性环境。

Landoni 等详细回顾了家养动物体内药物的立体选择行为^[70]。

因为立体选择过程与物种有关, 因此给予药物的外消旋物之后, 不同时间血浆浓度的对映体比率和血浆浓度-时间曲线下面积存在种间差异。不同物种体内的手性反转程度也不同, 只能通过给予目标物种单个对映体并采用灵敏的立体特异性分析方法检测生物体液和组织中对映体和旋光对映体的含量, 但用这种方法只能大致确定其手性反转程度。根据每个对映体的血浆浓度-时间数据获得药动学参数, 然后进行统计比较。

每种 2-芳基丙酸类 (“profen”) 非甾体抗炎药都包含单个手性中心, 是 $S (+)$ -和 $R (-)$ -对映体的外消旋混合物 (50:50); 但萘普生除外, 它仅由 $S (+)$ -对映体组成。由于环氧化酶活性的抑制作用, $S (+)$ -对映体属于优对映体 (潜在活性更强的对映体)。这些药物在药效学活性和药动学行为方面均有显著差异, 此外, 每种药物的对映体药动学也存在种间差异。给马、绵羊和 20 周龄犊牛静脉注射外消旋酮洛芬并测定血浆中的各对映体, 可以发现, 这些对映体在马体内的系统清除率以及在羊体内的系统清除率和分布容积均不同 (表 14), 但各对映体在犊牛体内的药动学参数值则相同^[71~73]。在马体内 $S (+)$ -和 $R (-)$ -对映体的曲线下面积比值为 1.35:1, 在羊体内是 0.54:1, 在犊牛体内是 1.05:1。在马血浆中占优势的对映体是 $S (+)$ -对映体, 羊是 $R (-)$ -对映体, 而犊牛则是二者浓度相同。分别给予上述动物单个对映体, 马体内 $R (-)$ -向 $S (+)$ -对映体的手性反转率据推测为 49%, 羊体内为 5.9%, 犊牛体内为 31%^[72,74,75]。单向手性反转在短尾猴 (猕猴属) 体内约为 49%^[76], 人体内为 9%^[77], 实验动物体为 27%~66%^[78]。Beagle 犬体内酮洛芬 $S (+)$ -对映体的口服生物利用度不受口服剂型内 $R (-)$ -对映体所占比重的影响, 尽管在犬体内很大部分 (73%) $R (-)$ -对映体会经代谢转化为 $S (+)$ -对映体^[79]。

表 14 给马 ($n=6$) 和绵羊 ($n=6$) 静脉注射外消旋酮洛芬 (KTP) 后描述 $S (+)$ -和 $R (-)$ -酮洛芬处置的药动学参数^[71,72]

药动学参数	马		绵羊	
	$S (+)$ -KTP	$R (-)$ -KTP	$S (+)$ -KTP	$R (-)$ -KTP
$t_{1/2(\alpha)}$ /h	0.13±0.03	0.10±0.02	0.14±0.01	0.13±0.03
$t_{1/2(\beta)}$ /h	1.51±0.45	1.09±0.19	0.86±0.08	0.87±0.10
V_d /(mL/kg)	491±206	472±146	256±21	168±15 ¹⁾
CL_B /[mL/(h·kg)]	202±22	277±35 ¹⁾	351±50	196±32 ¹⁾
MRT/h	2.23±0.15	2.63±0.33	0.79±0.11	0.95±0.13
AUC/(μg·h/mL)	5.67±0.47	4.19±0.37 ¹⁾	4.74±0.71	8.73±1.22 ¹⁾

1) $P < 0.05$ 。

数值表示为平均值±标准误。



通常人体血浆中 2-芳基丙酸类的 S (+)-对映体占据优势,而且给予外消旋物后 S (+)-和 R (-)-对映体的血浆浓度比会随给药时间而增加,这是因为 R (-)-对映体的手性中心向 S (+)-对映体发生了代谢反转^[80]。人体内 S (+)-对映体的消除速率通常小于 R (-)-对映体。由于通过肝脏微粒体生成辅酶 A 硫酯的速率不同^[81,82],非诺洛芬的手性反转程度在各物种间的差异很大。据推测,其在犬体内的反转率为 90%^[83],绵羊为 80%^[81],家兔为 73%^[84],人为 60%^[85],大鼠为 42%^[86],马为 38%^[83]。

卡布洛芬是一种环氧化酶的弱抑制剂,能在犬^[87]和马^[88]体内产生显著的抗水肿疗效,并具有潜在的抗血小板凝聚性能,在马、犍牛、犬、猫、人体内均不能发生任一方手性反转。静脉注射或口服给予马(静脉)、8~10 周龄犍牛(静脉)、猫(静脉)和犬(口服)外消旋卡布洛芬(含 50:50 的对映体)后,血浆中主要含有 R (-)-对映体,而且口服外消旋物后, R (-)-和 S (+)-对映体的血浆浓度比随着时间而增大。这主要是由于立体选择性肝脏代谢导致的,但也可能是发生了与血浆白蛋白的立体选择性结合。与家养动物的情况相反,大鼠和人类的血浆中主要含有 S (+)-对映体,且给予外消旋物后, R (-)-和 S (+)-对映体的血浆浓度比随着时间延长而降低(尽管在人体内仅有少许降低)^[89,90]。给予外消旋物以后,马体内 R (-)-和 S (+)-对映体的血浆浓度一时间曲线下面积(AUC)比值为 4.5:1^[91],猫体内为 2.0:1^[92],犬体内为 1.8:1^[87],犍牛体内为 1.4:1^[93],但未测定马和人体的比值。

氯胺酮的上市产品是 S (+)-和 R (-)-对映体 50:50 混合物,其可通过肝微粒体的去甲基作用代谢为相应的去甲基氯胺酮(代谢产物 I)对映体。根据文献报道,氯胺酮消旋体的 S (+)-和 R (-)-对映体的优劣比为 2.9:1,测定得到麻醉起效时人体内的血浆浓度 S (+)-对映体为 0.5μg/mL、R (-)-对映体为 1.7μg/mL,由此可知, S (+)-对映体活性比 R (-)-对映体大 3 倍^[94,95]。给马^[96]和犬^[97]静脉注射外消旋氯胺酮后,血浆中去甲基氯胺酮的 S (+)-对映体占优势,这可能是 N-脱甲基过程的对映选择性所致。外消旋氯胺酮的系统清除率在人、马、犬体内分别是 15mL/(min·kg)、28mL/(min·kg)、29mL/(min·kg)。由于未研究单个对映体给药后的处置情况,因而无法分析其手性反转程度。

在设计某个手性药物剂型的处方时,是采用其外消旋物还是某种对映体,取决于各对映体的相对药效活性、潜在毒性(或副作用)及其药动学特征,最重要的是看待给药物种体内各对映体的含量比例随时间的变化情况。血浆和组织蛋白的结合、肝微粒体氧化反应、可能存在的葡萄糖苷酸结合以及载体介导的分泌过程均具有立体选择性,且存在种间差异。对于以外消旋混合物形式口服给药的、能被肝脏大量捕集的手性药物,其首过代谢可能会影响对映体的口服生物利用度。若某个单手性中心药物的两个对映体均显示出所期望的药效(如多数阿片类、多巴酚丁胺、

布比卡因),尽管二者的药效活性不同或者起效时间以及产生的效应不具有立体选择性,处方中采用外消旋体混合物的做法也是完全合理的^[98]。但由于存在种间差异,应采用立体特异性分析方法^[99~102]来研究单个对映体的药动学特性,以便分别为不同物种设计给药方案。如果两对映体的药动学特性[例如, S (-)-心得安属于 2-芳基丙酸类非甾体抗炎药的 S (-)-对映体, d-丙氧吩]或者潜在毒性(左旋咪唑是外消旋四咪唑的 l-异构体,后者有多种副作用)差异很大,则在设计剂型处方时应该考虑选用活性较强的对映体(优对映体)。为了选择性地获得特定疗效,对于特定剂型的处方可以选用劣对映体(活性较弱的对映体)。例如, R (+)-噻吗洛尔制成的滴眼液能降低眼内压(青光眼),用 R (+)-维拉帕米制成的注射或口服剂型可治疗心绞痛^[103]。应用单一对映体(单个化学实体)能提高效应的选择性,避免完全接触外消旋物,并能简化剂量-应答关系。当剂型处方中选用某一种对映体时,必须保证达到它所需的光学纯度。评价普通药物制剂的等效性要求该制剂含有外消旋物或者含有新(参比)剂型中的对映体。

透皮吸收

活体牛、山羊和犬的皮肤约占体重的 10%,马为 7.5%,人为 3.7%。尽管皮肤接收的心输出量仅为 6%,但各部分皮肤血流速率不同^[104]。人和猪的皮肤血液循环同时向皮肤下的肌肉组织提供血液(通过肌皮动脉),但犬和猫(皮肤松弛的物种)的血液则是直接供给皮肤。

1. 吸收过程

外用药物的吸收过程是:药物自基质中溶出并释放出来,扩散穿透角质层,渗透穿过表皮“活”层进入其下的真皮进而被吸收进入系统循环。尽管初始阶段受处方的影响(因为处方与药物形态和基质性质有关),但迁移阶段主要受控于药物的分子结构和理化性质。吸收过程中的限速步骤是穿透角质层^[105]。只有脂溶性药物才能透过角质层中死亡、致密且角化的细胞其扩散透过表皮(包括通过角质层)的途径有:通过角化细胞的穿透细胞途径,过脂质骨架的细胞间途径,通过汗腺管和毛囊(附属物途径)。尽管亲脂性物质可能以跨细胞扩散的方式透过角质层,但透过表皮的“活”层则需要具备一定的水溶性。极性药物透过角质层的能力较差,但却可能经由“活”的上皮层沿附属物途径分流扩散透过角质层。影响透皮吸收的其他因素还包括基质性质、角质层水合程度、药物在角质层或表皮其他层的滞留性、表皮内的生物转化以及皮肤组织结构的种间差异。水生哺乳动物的角质层很厚,角化细胞排列稳固,且无论无毛(如鲸)或有毛(如海豹)的表皮均没有颗粒层^[106]。

试验和家养动物以及人的皮肤角质层的平均厚度为 10~35μm,这样的厚度可能不会影响化学物质的渗透,但其单位面积上的附属物密度(存在种间差异)会影响透

皮行为。人的皮肤大概平均每平方厘米就有 40~70 个毛囊和 200~250 个汗腺,而牛的皮肤则每平方厘米大约有 2000 个毛囊以及汗腺和皮脂腺^[107]。英国绵羊的皮肤上每平方厘米的平均毛囊数为 1000~2000 个,次级毛囊与初级毛囊的比值为 2.4:1~5.9:1^[108]。Merino 绵羊被毛区域的皮肤上次级-初级毛囊比值较高。牛和绵羊的皮脂腺分泌出大量脂质物(绵羊分泌的是羊毛脂)以保护皮肤,这些体表分泌物所具有的乳化特性可能促进外用药物的溶出,进而提高其透皮吸收。分泌物组分的季节性变化可能会导致中度脂溶性药物(如以泼背方式给予左旋咪唑)的吸收行为发生改变^[109]。由于单位面积上皮肤附属物的数量巨大,牛和绵羊的附属物途径对亲水性物质透皮吸收的贡献可能会大于其他物种。马和人的汗腺活动性很高,而牛、绵羊、猪、犬和猫的汗液分泌则不太活跃。环境温度的变化对动物皮肤温度的影响比对人皮肤温度的影响更大,说明与动物皮肤相比,人体皮肤在体温调节中的地位更为重要。

角质层的水合程度(一般为 10%~15%)会影响化学物质的渗透速率。若将水合程度增至 50%,某些化学物质穿过表皮的渗透速率可增至 10 倍^[110]。已经证明,闭锁剂能够提高外用氢化可的松和醋酸氟轻松的药物效应^[111],但药物的透皮吸收却未必会增加。闭锁诱导吸收增加的程度随着药物亲脂性的增大而提高。

含有丙二醇或十二烷基磺酸钠等吸收促进剂的处方可能会提高水溶性药物的角质层渗透性能。丙二醇是兽类外用皮质激素制剂的常用基质。各种非质子性溶剂,如二甲乙酰胺、二甲甲酰胺、二甲亚砷、四氢糠醛以及 2-吡咯烷酮,可用作极性药物的渗透促进剂^[112]。二甲亚砷(DMSO)用于某些局部兽用制剂的处方。DMSO 渗透促进性能的浓度依赖性显著。当水中 DMSO 浓度低于 50%时,多数药物的渗透速率与其水溶液仅有很小的差异。含 DMSO(浓度不确定)的左旋咪唑处方在牛和绵羊皮肤上的渗透速率甚至稍小于左旋咪唑水溶液^[107]。牛泼背给予左旋咪唑后,其血浆和胃肠道液中药物的浓度小于口服给药或皮下注射给药途径^[109]。含有 DMSO 的处方,对硫磷穿透猪皮肤的速率大于含其他基质(甘油缩甲醛/异丙醇混合物、辛醇和聚乙二醇-400)的处方(表 15)^[113]。当 DMSO 浓度为 67%(v/v)时形成稳定的 2:1 水合物,这可以解释其高浓度时的脱水 and 渗透促进作用^[114]。这些作用伴随着、或者导致了表皮组织损伤。矿物油可用于合成除虫菊酯(氯菊酯、氰菊酯)的长效、水性外用制剂处方,供反刍动物使用。这类制剂不会被雨水冲洗除去并能在较长时期内预防蚊蝇。水不溶性物质可以制成乳油。乳油包含一种或多种表面活性剂,当含药非水溶剂与水混合时形成乳液或胶团溶液^[107]。

表 15 不同基质对硫磷制剂局部给药(50mg/kg)后的药动学参数^[113]

药动学参数	基质			
	GFI ¹⁾	DMSO	辛醇	Macrogol 400
AUC/($\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$)	1460~1795	1630~3050	2010~3310	595~600
MRT/h	57~106	9.7~14.5	22~31	54~60
MAT/h	55~104	7.5~12.5	20~29	52~58
BA/%	16~20	19~28	15~29	3.9~54

1) GFI=甘油缩甲醛/异丙醇混合物。

生物利用度(绝对)为 $\text{AUC}_{\text{外用}}/\text{AUC}_{\text{静注}}$,并根据剂量校正。

2. 种间差异

皮肤的屏障特性存在种间差异,甚至在同种动物的不同身体部位也有变化。皮肤渗透性的体外研究资料,各物种的皮肤渗透性大致为:家兔>大鼠>豚鼠>猫>犬>猪和猕猴>人类(皮肤渗透性最差)。由于缺乏资料表明,皮肤渗透性大小排序中未能包括马、牛、绵羊和山羊。对于反刍动物类,一般认为其皮脂的乳化性能和闭合效应以及单位皮肤表面高度密集的附属物有利于透皮吸收。

有机磷化合物在取自各类动物胸背部的离体皮肤片段上的最大穿透速率大致符合前述渗透顺序(表 16)^[115]。该化合物能够迅速透过家兔和大鼠的皮肤,而对猪皮肤的透过速率明显小于其他物种的皮肤。尽管猪皮肤和人皮肤在很多方面都很相似^[116],但大量化合物的在猪体的透皮吸收率是人的 0~4 倍^[117]。体外模型中采用离体的灌注猪皮瓣

法充分利用了猪和人皮肤相似的渗透特征,同时避免在体外研究中系统/脂肪分布差异的影响^[118,119]。化学物质的扩散透皮速率及其在皮肤内的代谢可由灌注液药物含量确定。由化合物扩散进入灌注液的总量以及透皮过程终点的残余量可以预测其透皮吸收情况。

透皮吸收率对药物系统利用度的贡献取决于局部用药的部位。猕猴(*Macaca mulatta*)可作为研究人皮肤部位吸收差异的动物模型^[120]。局部用药的绝对生物利用度只能通过测定血药浓度并比较药时曲线下总面积确定,或者测定局部和静脉注射给药后至少 6 个半衰期内的尿药含量,但后者可靠性稍差。尽可能采用实验设计中的交叉研究方法,且在两相之间设置适当的洗净期。由于皮肤在超微结构、供血量、单位表面面积的附属物密度以及生物转化途径的活性等方面存在差异,药物的透皮吸收(速率和程度)最好采用待给药的动物种类进行测定。

表 16 放射标记的有机磷化合物在各类动物胸背部
离体皮肤上测得的最大渗透速率^[115]

动物种类	渗透速率/[$\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{min})$]
猪	0.3
犬	2.7
猴	4.2
山羊	4.4
猫	4.4
豚鼠	6.0
家兔	9.3
大鼠	9.3

3. 皮肤生物转化

角质层和颗粒层脂质骨架内含的表皮细胞色素 P450 和水解酶可能参与了局部给药留体的转化反应^[121]。已经证实,猪表皮细胞色素 P450 通过氧化脱硫将对硫磷转化为对氧磷^[122],所生成的氧化物迅速水解为非活性代谢产物。哺乳动物和昆虫类在水解反应速率上的显著差异说明了硫代磷酸盐杀虫剂具有选择性毒性。水生和陆生哺乳动物表皮超微结构差异的程度对皮肤内药物代谢酶类的影响尚不明确。鱼类似乎无法解除硫代磷酸盐杀虫剂的毒性。

过氧化苯甲酰是某些犬用洗发香波中的活性成分,几乎在表皮就被全部代谢为苯甲酸。苯甲酸与主要存于肝脏内的甘氨酸结合并以马尿酸的形式随尿液排出。去甲肾上腺素经甲基化成为肾上腺素的反应属于 N-转移酶介导的结合反应,在人和动物皮肤用制剂的研究中均有报道^[123]。

心得安在肝脏和皮肤内的生物转化过程具有立体选择性,并涉及微粒体介导的氧化反应和葡糖醛酸结合。利用完整的人体皮肤和微粒体制剂进行外消旋心得安的透皮吸收和代谢过程的体外研究,结果发现, S (-)-对映体(优对映体)在皮肤内的代谢效率高于 R (+)-对映体^[124]。而肝细胞则相反,对 R (+)-对映体的代谢效率更高^[125]。皮肤和肝脏内的细胞色素 P450 单氧酶可被药物诱导(如被地塞米松诱导)或抑制(氯霉素、咪唑类抗真菌药)。表皮内微粒体酶活性变化的临床指征还未建立。用甲硝达唑制成外用凝胶,能抑制乙醛脱氢酶(一种非微粒体酶),但这种酶是否存在于皮肤内尚不明确。

4. 外用制剂

可用于皮肤给药的兽用局部制剂种类繁多。尽管其中大多数都只能产生局部疗效,但也有一些处方能够通过与皮肤相连的系统循环扩散至全身并产生全身疗效。由于外寄生虫的流行,几种抗外寄生虫制剂已有产品供局部给药,具体给药方法取决于动物种类(表 17)。经适当稀释使用的浓缩液体和预备溶液便于给药,但能否取得良好的治疗效

果并在较长时间内预防复发取决于外寄生虫的易感性和药物在皮肤内的滞留性能。预备溶液的常见给药方法是给牛、羊、猪和马大面积泼背,给人和猫局部点背。泼背用制剂中的活性成分必须具有较高的脂溶性以利于透皮吸收,且在角质层和生长层应具有不被环境条件(如雨水)或摩擦除去的剩余活性。稀释后的浓缩液体可喷雾用于牛、马、猪、家禽,浸泡或喷雾用于羊。由于给羊浸泡需要大量药物且很难安全地实施,因此稀释的浓缩液体(浸泡用)常采取喷雾给药,但后者所需浓度高于浸泡方法。喷雾方式已成为广受牧羊主人欢迎的驱虫剂给药方法。在治疗和预防羊的外寄生虫感染方面,相对于浸泡,喷雾的有效性还有待研究。要在有机磷化合物(二嗪啉、巴胺磷)和合成除虫菊酯(氟氯苯菊酯、氯氰菊酯)二者间选择一种用于羊浸泡给药时,应考虑可行性(除了避免残余药物之外),若采用合成除虫菊酯则没有消除期。除虫菊酯类对哺乳动物的毒性较低,主要是因为它能够迅速地水解和(或)羟基化而发生生物转化(I 相代谢反应)。与哺乳动物不同,鱼类对除虫菊酯的毒性很敏感。

表 17 各动物种类局部用抗外寄生虫药物制剂
的剂型和给药方法

动物种类	剂型	给药方法
牛	溶液	泼背
	浓缩液体 ¹⁾	喷雾
	耳标	贴耳
羊	浓缩液体 ¹⁾	浸泡, 喷雾
	溶液	点背, 泼背
猪	溶液	泼背, 点背
	浓缩液体 ¹⁾	喷雾
马	溶液	泼背
	浓缩液体 ¹⁾	喷雾, 洗浴
	洗液	轻拍敷用
犬和猫	溶液	点背, 喷雾(犬)
	项圈	绕颈
	爽身粉	用于皮肤
	浓缩液体 ¹⁾	海绵擦拭
	洗发香波	清洗(犬)

1) 浓缩液体在给予动物之前必须经过适当稀释。

合成除虫菊酯类(氯氰菊酯、溴氰菊酯、氰戊菊酯、氟氯苯菊酯、氯菊酯)有多种剂型可供局部给予家养动物(表 18)。某种除虫菊酯的剂型适宜与否主要取决于动物种类,但也需要适当考虑所感染的外寄生虫和昆虫种类。气雾剂用于犬比用于猫更适宜,因为猫惧怕(恐惧反应)被喷射而且缺少适合猫皮毛的制剂产品。有文献报道,含合成除虫菊酯类——氰戊菊酯(0.09%)和避蚊胺的复方制剂可致猫急性中毒,偶尔也引发犬中毒^[126,127]。



表 18 含合成除虫菊酯类制剂的剂型和局部给予各类动物的方法

剂型	动物种类	给药方法
溶液	牛、羊、马、猪、犬和猫	泼背 点背, 喷雾 (犬)
浓缩液体	牛、羊、马、家禽	喷雾, 浸泡 (羊)
爽身粉	犬、猫	用于皮肤
洗发香波	犬	清洗
项圈	犬、猫	绕颈
耳标	牛	贴耳

注: 合成除虫菊酯类: 氯氰菊酯、溴氰菊酯、氰戊菊酯、氟氯苯菊酯、氯菊酯。

大环内酯类抗寄生虫药 (阿维菌素类和米贝菌素类) 在低浓度时即有抗体内 (线虫类) 和体外 (节肢动物) 寄生虫的活性。阿维菌素的兽用制剂包括注射液 (皮下注射用)、各种口服剂型和外用溶液 (表 19)。不同制剂专为特定动物种类设计。伊维菌素或道拉菌素的外用溶液用于给牛泼背, 而塞拉菌素的外用溶液则用于给犬和猫点背。点背用的制剂包括含抗外寄生虫药的浓缩溶液, 应直接用于一个 (猫) 或两个 (犬) 动物无法舔食吸收药物的部位的皮肤上, 后颈即为此类给药部位之一。给药总剂量应根据动物种类 (猫用小剂量) 和体重 (犬) 进行调整。如塞拉菌素溶液有 6 种剂量 (15~240mg) 规格的产品可供选用。

表 19 用于各类动物的阿维菌素剂型和给药途径

剂型	阿维菌素	动物种类	给药途径
注射用			
溶液	阿维菌素, 道拉菌素	牛、羊	皮下注射
	阿维菌素	猪、(猫)	皮下注射
口服用			
溶液	阿维菌素	绵羊、山羊	淋湿
控释瘤胃丸剂	阿维菌素	牛	口服
控释瘤胃胶囊	阿维菌素	绵羊	口服
预混剂	阿维菌素	猪	混入饲料
糊剂	阿维菌素	马	口服
片剂	阿维菌素	犬	口服
局部外用			
溶液	阿维菌素, 道拉菌素	牛	泼背
溶液	塞拉菌素	犬、猫	点背

表 20 列出了牛用抗外寄生虫药的类型和剂型。尽管不同药物类型可能对相同外寄生虫类均有杀灭作用, 但归类不同的药物其临床疗效不同。临床疗效的定量差异与寄生虫的易感性以及寄生部位合并用药效应和药物在皮肤内的

滞留有关, 而寄生虫的易感性可随抗药性的产生而降低。药物的渗入和滞留受到药物理化性质、制剂处方和动物给药方法的影响。

表 20 用于牛的代表性抗外寄生虫药物

抗外寄生虫药类别 (代表药物)	治疗范围	剂型 (给药方法)
有机磷类		
(益灭松)	螨、虱皮蝇幼虫	溶剂 (泼背)
除虫菊酯类		
(氯氰菊酯)	虱、蝇	溶剂 (泼背)
(溴氰菊酯)		溶剂 (点背)
(氰戊菊酯)		浓缩液体 (喷雾用) ¹⁾
(氯菊酯)		耳标
脘类		
(双甲脒)	虱、螨、壁虱	浓缩液体 (喷雾用)
阿维菌素类		
(伊维菌素)	螨、虱	溶剂 (泼背)
(道拉菌素)	骚扰血蝇	注射液

续表

抗外寄生虫药类别 (代表药物)	治疗范围	剂型 (给药方法)
(阿巴汀)	皮蝇幼虫	(皮下注射)
(埃普利诺菌素)		控释瘤胃丸剂 (伊维菌素)
米贝菌素类: (莫西菌素)	与阿维菌素相似	溶剂 (泼背); 注射液 (皮下注射)

1) 浓缩液体用前须经适当稀释。

含抗菌素的皮肤病用剂型包括气雾剂 (盐酸土霉素、硫酸新霉素的丙二醇溶液)、凝胶 (甲硝唑, 呋西地酸)、乳膏 (硫酸庆大霉素, 新霉素和杆菌肽锌, 磺胺嘧啶银)、油膏 (盐酸金霉素, 呋西地酸钠, 硫酸新霉素 B 和短杆菌肽, 硫酸新霉素, 杆菌肽锌, 硫酸多黏菌素 B) 和爽身粉 (盐酸金霉素和苯左卡因)。制剂类型影响着活性成分的稳定性和释放。凝胶和乳膏一般较易给予动物, 但其封闭性小于油膏。油膏中药物作用持续时间较长, 其闭合效应可能促进制剂中活性成分在感染部位的吸收。

对抗菌素的选择应基于临床诊断结果, 并尽可能对分离的微生物进行体外培养和易感性试验 (若有必要)。在治疗浅表皮肤感染时, 采用局部抗菌制剂即有效。但是对于严重的深度皮肤感染则必须采用局部和全身治疗。为了避免机体产生抗药性, 需要适当考虑联合用药品种的作用机制。

对于由丝状真菌和皮肤真菌引起的皮霉菌感染可采用局部或者全身治疗, 这取决于皮肤损伤的部位和程度。局部抗真菌制剂的处方应能促进感染部位的药物渗透和滞留。可局部应用的药物包括各种咪唑衍生物 (克霉唑、恩康唑、酮康唑、咪康唑)、纳他霉素、制霉菌素、托萘酯, 口服应用的药物包括酮康唑、氟康唑、伊曲康唑、制霉菌素和灰黄霉素。治疗由假丝酵母菌 (*Candida* spp.) 引起的浅表感染可局部给予咪唑衍生物或制霉菌素。

对于家养动物和人来说, 引发皮肤感染的常见真菌生物体有须癣毛癣菌 (*Trichophyton Mentagrophytes*, 使 2~7 月龄牛患癣病)、石膏样小孢子菌 (*Microsporum gypseum*) 和疣状癣菌 (*T. verrucosum*) (除犬和猫外的所有动物种类)。浅表霉菌皮肤感染也可能是由马发癣菌 *T. equinum* (马、牛、人)、猪小孢子菌 *M. nanum* (猪、牛、人) 和犬小孢子菌 *M. canis* (犬和猫) 引起的。马所患的丝状真菌性角膜炎常由镰刀菌 *Fusarium* spp. 引起。酵母, 主要是假丝酵母能引发奶牛乳腺炎和母马子宫炎, 偶尔还会寄居在犬的皮肤上、主要是在皮肤黏膜结合部位。

对于外用制剂, 咪唑和制霉菌素被制成乳膏, 戊菌唑和制霉菌素则制成油膏。由恩康唑制成的浓缩液, 必须稀释后才能给马和犬通过洗浴方式用药, 或者给牛喷雾用药。外用恩康唑可以与灰黄霉素联合系统 (口服) 治疗。目前已有单用酮康唑、硝酸咪康唑联合葡萄糖酸氯己定应用的犬用洗发香波上市。局部给药后, 咪唑类很快达到有效浓度并滞留在表皮外层, 透皮吸收量很小。游霉素的上市制剂为混悬液, 稀释后喷雾给予马或牛。除了给患癣病的马喷

雾以外, 所有马用器具和装备均须彻底清洁, 并在盛有稀释游霉素混悬液的塑料或镀锌容器内浸泡。游霉素 (5% 水性混悬液) 治疗丝状真菌性角膜炎很有效, 尤其是对于受镰刀菌感染的马。抗真菌唑类的选择性作用是由于其对真菌的亲性和性远远大于哺乳动物细胞色素 P450 酶系。由于咪唑衍生物 (克霉唑、恩康唑、酮康唑、咪康唑) 活性的选择性低于三唑类 (伊曲康唑、氟康唑), 一般认为前一种对内源性类固醇激素的干扰作用更强, 且与其他受微粒介导发生生物转化的药物产生药动学相互作用的概率更大。

皮质类固醇局部给药的疗效主要源于其抗炎活性。局部应用皮质类固醇的相对有效率符合以下顺序: 氢化可的松、倍他米松、泼尼松龙 < 氢化可的松戊酸酯或丁酸酯、倍他米松戊酸酯、醋酸曲安奈德、醋酸氟轻松、二丙酸倍他米松酯、氟轻松。除了皮质类固醇的类型、溶解度及所用浓度以外, 其临床疗效还受制剂处方的影响, 但浓度对疗效的影响较小。油膏性糖皮质激素类固醇处方比乳膏或洗液处方的疗效更好, 这可能是因为油膏具有封闭效应, 利用封闭性外层能更进一步促进类固醇在角质层的渗透和滞留 (仓储效应)^[112,128]。

5. 透皮治疗系统

透皮治疗系统是一种用于皮肤表面的控速给药系统, 能以一定速率持续释药, 并在给定时期内保持预期的稳态血药浓度。

透皮治疗系统如 72h 恒速释药的芬太尼 (主要是 α -阿片受体激动剂) 制剂, 可用于控制犬术后 (外科) 疼痛。置于 Beagle 犬胸腔背侧的透皮系统每小时释放 50 μ g 芬太尼, 其平均稳态血药浓度为 1.6 ng/mL, 在能够麻醉而不产生明显副作用的血药浓度范围 (1~2 ng/mL) 内。在给予透皮系统约 24h 后到达芬太尼的稳态血药浓度 (根据芬太尼在 Beagle 犬体内的半衰期 6h 可以推知), 并一直维持到 72h 除去给药系统时。由于释药速率 (3.7 μ g/h \cdot kg) 超过了系统清除速率 (2.7 μ g/h \cdot kg), 芬太尼的透皮利用度为 64%, 可能原因是释放的药物有一部分滞留在角质层内, 或者是在被吸收进入系统循环之前就在表皮被代谢掉, 还可能是因为药物的系统利用度不完全。在血药浓度达到产生麻醉效应的阈值之前有 24h 的延迟期, 因此在手术前可以给予静脉注射 (约 30 μ g/kg) 或者是提前 12h 给予透皮系统。

当给予动物杀虫剂项圈或透皮系统等给药装置时, 在整个治疗过程中若要选择任意途径给予另一种药物, 必须注意, 此时发生药物相互作用的可能性较大。

参考文献

1. Foster, T. P. Protein/Peptide Veterinary Formulations. Development and Formulation of Veterinary Dosage Forms; Hardee, G. E., Baggot, J. D., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1998; 231—282.
2. Hansel, W.; McEntee, K. Female Reproductive Processes. Duke's Physiology of Domestic Animals; Swenson, M. J., Ed.; Comstock Publishing Associates (Cornell University Press): Ithaca, NY, 1977; 772—800.
3. Hogben, C. A. M.; Tocco, D. J.; Brodie, B. B.; Schanker, L. S. On the Mechanism of Intestinal Absorption of Drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1959, 125, 275—282.
4. Theeuwes, F.; Bayne, W. Dosage Form Index; An Objective Criterion for Evaluation of Controlled-Release Drug Delivery Systems. *J. Pharm. Sci.* 1977, 66, 1388—1392.
5. Koritz, G. D.; McKiernan, B. C.; Neff-Davis, C. A.; Munsiff, I. J. Bioavailability of Four Slow-Release Theophylline Formulations in the Beagle Dog. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1986, 9, 293—302.
6. Dohoo, S. Steady-State Pharmacokinetics of Oral Sustained-Release Morphine Sulphate in Dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1997, 20, 129—133.
7. Maitho, T. E.; Lees, P.; Taylor, J. B. Absorption and Pharmacokinetics of Phenylbutazone in Welsh Mountain Ponies. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1986, 9, 26—39.
8. van Duijkeren, E.; Vulto, A. G.; Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbann, M. M.; Kessels, B. G. F.; van Miert, A. S. J. P. A. M.; Breukink, H. J. Pharmacokinetics of Trimethoprim-Sulphaclorpyridazine in Horses after Oral, Nasogastric and Intravenous Administration. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1995, 18, 47—53.
9. Hungate, R. E. The Rumen and its Microbes; Academic Press: New York, 1966; 218.
10. Phillipson, A. T.; McAnally, R. A. Studies on the Fate of Carbohydrates in the Rumen of the Sheep. *J. Exp. Biol.* 1942, 19, 199—214.
11. Masson, M. J.; Phillipson, A. T. The Absorption of Acetate, Propionate and Butyrate from the Rumen of Sheep. *J. Physiol. (Lond)* 1951, 113, 189—206.
12. Dobson, A. Physiological Peculiarities of the Ruminant Relevant to Drug Distribution. *Federation Proceedings* 1967, 26, 994—1000.
13. Clark, R.; Wessels, J. J. The Influences of the Nature of the Diet and of Starvation on the Concentration Curve of Sulphanilamide in the Blood of Sheep After Oral Dosing. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1952, 25, 75—83.
14. Masson, M. J.; Phillipson, A. T. The Composition of the Digesta Leaving the Abomasum of Sheep. *J. Physiol. (Lond)* 1952, 116, 98—111.
15. Gingerich, D. A.; Baggot, J. D.; Yeary, R. A. Pharmacokinetics and Dosage of Aspirin in Cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1975, 167, 945—948.
16. Ali, D. N.; Hennessy, D. R. The Effect of Temporarily Reduced Feed Intake on the Efficacy of Oxfendazole in Sheep. *Int. J. Parasitol.* 1995, 25, 71—74.
17. Taylor, S. M.; Malton, T. R.; Blanchflower, J.; Kennedy, D. G.; Hewitt, S. A. Effects of Dietary Variations on Plasma Concentrations of Oral Flukicides in Sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1993, 16, 48—54.
18. Rowlands, D. ap T.; Shepherd, M. T.; Collins, K. R. The Oxfendazole Pulse Release Bolus. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1988, 11, 405—408.
19. Singh, B. N.; Kim, K. H. Floating Drug Delivery Systems: An Approach to Oral Controlled Drug Delivery Via Gastric Retention. *J. Controlled. Release* 2000, 63, 235—259.
20. Mallis, G. I.; Schmidt, D. H.; Lindenbaum, J. Superior Bioavailability of Digoxin Solution in Capsules. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1975, 18, 761—768.
21. Johnson, B. F.; Bye, C.; Jones, G.; Sabey, G. A. A Completely Absorbed Oral Preparation of Digoxin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1976, 19, 746—751.
22. Lindenbaum, J. Greater Bioavailability of Digoxin Solution in Capsules: Studies in the Postprandial State. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1977, 21, 278—282.
23. Angelucci, L.; Petrangeli, B.; Celletti, P.; Favilli, S. Bioavailability of Flufenamic Acid in Hard and Soft Gelatin Capsules. *J. Pharm. Sci.* 1976, 65, 455—456.
24. Landoni, M. F.; Lees, P. Influence of Formulation on the Pharmacokinetics and Bioavailability of Racemic Ketoprofen in Horses. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1995c, 18, 446—450.
25. Baggott, D. G.; Ross, D. B.; Preston, J. M.; Gross, S. J. Nematode Burdens and Productivity of Grazing Cattle Treated with a Prototype Sustained-Release Bolus Containing Ivermectin. *Vet. Rec.* 1994, 135, 503—506.
26. Berghen, P.; Hilderson, H.; Vercruysse, J.; Claerebout, E.; Dorny, P. Field Evaluation of the Efficacy of the Fenbendazole Slow-Release Bolus in the Control of Gastrointestinal Nematodes of First-Season Grazing Cattle. *Vet. Q.* 1994, 16, 161—164.
27. Laby, R. H. US Patent 3, 844, 284, 1974.
28. Klink, P. R.; Ferguson, T. H.; Magruder, J. A. Formulation of Veterinary Dosage Forms. Development and Formulation of Veterinary Dosage Forms; Hardee, G. E., Baggot, J. D., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1998, 145—229.

29. Firth, E. C.; Nouws, J. F. M.; Driessens, F.; Schmaetz, P.; Peperkamp, K.; Klein, W. R. Effect of the Injection Site on the Pharmacokinetics of Procaine Penicillin G in Horses. *Am. J. Vet. Res.* 1986, 47, 2380—2384.
30. Rasmussen, F. Tissue Damage at the Injection Site after Intramuscular Injection of Drugs in Food-Producing Animals. *Trends in Veterinary Pharmacology and Toxicology*; van Miert, A. S. J. P. A. M., Frens, J., van der Kreek, F. W., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1980; 27—33.
31. Nouws, J. F. M. Irritation, Bioavailability and Residue Aspects of Ten Oxytetracycline Formulations Administered Intramuscularly to Pigs. *Vet Q* 1984, 6, 80—84.
32. Nouws, J. F. M. Injection Sites and Withdrawal Times. *Annal. de Rech. Vet.* 1990, 21 (Suppl 1), 145S—150S.
33. Banting, A. deL.; Tranquart, F. Echography as a Tool in Clinical Pharmacology. *Acta. Vet. Scand. Suppl.* 1991, 87, 215—216.
34. Aktas, M.; Lefebvre, H. P.; Toutain, P.-L.; Braun, J. P. Disposition of Creatine Kinase Activity in Dog Plasma Following Intravenous and Intramuscular Injection of Skeletal Muscle Homogenates. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1995, 18, 1—6.
35. Toutain, P.-L.; Lassourd, V.; Costes, G.; Alvinerie, M.; Bret, L.; Lefebvre, H. P.; Braun, J. P. A Non-Invasive and Quantitative Method for the Study of Tissue Injury Caused by Intramuscular Injection of Drugs in Horses. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1995, 18, 226—235.
36. Nouws, J. F. M.; Vree, T. B. Effect of Injection Site on the Bioavailability of an Oxytetracycline Formulation in Ruminant Calves. *Vet. Q.* 1983, 5, 165—170.
37. Korsrud, G. O.; Boison, J. O.; Papich, M. G.; Yates, W. D. G.; MacNeil, J. D.; Janzen, E. D.; Cohen, R. D. H.; Landry, D. A.; Lambert, G.; Yong, M. S.; Messier, J. R. Depletion of Intramuscularly and Subcutaneously Injected Procaine Penicillin G from Tissues and Plasma of Yearling Beef Steers. *Can. J. Vet. Res.* 1993, 57, 223—230.
38. Wheaton, J. E.; Al-Raheem, S. N.; Godfredson, J. A.; Dorn, J. M.; Wong, E. A.; Vale, W. W.; Rivier, J.; Mowles, T. F.; Heimer, E. P.; Felix, A. M. Use of Osmotic Pumps for Subcutaneous Infusion of Growth Hormone-Releasing Factors in Steers and Wethers. *J. Anim. Sci.* 1988, 66, 2876—2885.
39. Golenz, M. R.; Wilson, W. D.; Carlson, G. P.; Craychee, T. J.; Mihalyi, J. E.; Vincox, L. Effect of Route of Administration and Age on the Pharmacokinetics of Amikacin Administered by the Intravenous and Intramuscular Routes to 3- and 5-Day-Old Foals. *Equine. Vet. J.* 1994, 26, 367—373.
40. Baggot, J. D.; Brown, S. A. Basis for Selection of the Dosage Form. *Development and Formulation of Veterinary Dosage Forms*; Hardee, G. E., Baggot, J. D., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1998; 7—143.
41. Wilson, R. C.; Duran, S. H.; Horton, C. R., Jr.; Wright, L. C. Bioavailability of Gentamicin in Dogs after Intramuscular or Subcutaneous Injections. *Am. J. Vet. Res.* 1989, 50, 1748—1750.
42. Baggot, J. D.; Ling, G. V.; Chatfield, R. C. Clinical Pharmacokinetics of Amikacin in Dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1985, 46, 1793—1796.
43. Craigmill, A. L.; Brown, S. A.; Wetzlich, S. E.; Gustafson, C. R.; Arndt, T. S. Pharmacokinetics of Ceftiofur and Metabolites After Single Intravenous and Intramuscular Administration and Multiple Intramuscular Administration of Ceftiofur Sodium to Sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1997, 20, 139—144.
44. Rasmussen, F.; Svendsen, O. Tissue Damage and Concentration at the Injection Site After Intramuscular Injection of Chemotherapeutics and Vehicles in Pigs. *Res. Vet. Sci.* 1976, 20, 55—60.
45. Lanusse, C.; Lifschitz, A.; Virkel, G.; Alvarez, L.; Sanchez, S.; Sutra, J. F.; Galtier, P.; Alvinerie, M. Comparative Plasma Disposition Kinetics of Ivermectin, Moxidectin and Doramectin in Cattle. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1997, 20, 91—99.
46. Banting, A. deL.; Baggot, J. D. Comparison of the Pharmacokinetics and Local Tolerance of Three Injectable Oxytetracycline Formulations in Pigs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1996, 19, 50—55.
47. Nouws, J. F. M.; van Ginneken, C. A. M.; Hekman, P.; Ziv, G. Comparative Plasma Ampicillin Levels and Bioavailability of Five Parenteral Ampicillin Formulations in Ruminant Calves. *Vet. Q.* 1982, 4, 62—71.
48. Agero, H.; Friis, C. Bioavailability of Amoxycillin in Pigs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1998, 21, 41—46.
49. Marshall, A. B.; Palmer, G. H. Injection Sites and Drug Bioavailability. In *Trends in Veterinary Pharmacology and Toxicology*; van Miert, A. S. J. P. A. M., Frens, J., van der Kreek, F. W. Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1980, 54—60.
50. Baggot, J. D. Principles of Drug Disposition in Domestic Animals; The Basis of Veterinary Clinical Pharmacology; WB Saunders: Philadelphia, 1977, 10—13, 73—112.
51. Rasmussen, F. Studies on the Mammary Excretion and Absorption of Drugs; Carl Fr. Mortensen: Copenhagen, 1966.
52. Prescott, J. F.; Baggot, J. D. Principles of Antimicrobial

- Drug Disposition; Antimicrobial Drug Use in Bovine Mastitis. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 2nd Ed., Iowa State University Press; Ames Iowa, 1993; 37—60, 553—561.
53. Ziv, G. Drug Selection and Use in Mastitis; Systemic Vs Local Drug Therapy. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1980, 176, 1109—1115.
54. Pyorala, S. Staphylococcal and Streptococcal Mastitis. The Bovine Udder and Mastitis; Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L., Pyorala, S., Eds.; University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine; Helsinki, 1995; 143—148.
55. Sandholm, M.; Pyorala, S. Coliform Mastitis. The Bovine Udder and Mastitis; Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L., Pyorala, S., Eds.; University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine; Helsinki, 1995; 149—160.
56. Baggot, J. D.; McKellar, Q. A. The Absorption, Distribution and Elimination of Anthelmintic Drugs; The Role of Pharmacokinetics. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1994, 17, 409—419.
57. Benet, L. Z. Pharmacokinetic Parameters: Which are Necessary to Define a Drug Substance? *Eur. J. Resp. Dis.* 1984, 65 (Suppl. 134), 45—61.
58. Williams, R. T. Detoxication Mechanisms; Chapman & Hall; London, 1959, 1—22, 732—740.
59. Williams, R. T. Comparative Patterns of Drug Metabolism. *Fed. Proc.* 1967, 26, 1029—1039.
60. Williams, R. T. Species Variations in Drug Biotransformations. Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition; LaDu, B. N., Mandel, H. G., Way, E. L., Eds.; Williams & Wilkins; Baltimore, 1971; 187—205.
61. Frey, H. -H.; Loscher, W. Pharmacokinetics of Anti-Epileptic Drugs in the Dog; A Review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1985, 8, 219—233.
62. French, M. R.; Bababunmi, E. A.; Golding, R. R.; Basir, O.; Caldwell, J.; Smith, R. L.; Williams, R. T. The Conjugation of Phenol, Benzoic Acid, I-Naphthylacetic Acid and Sulphadimethoxine in the Lion, Civet and Genet. *FEBS Letters* 1974, 46, 134—137.
63. Boxenbaum, H. Interspecies Scaling, Allometry, Physiological Time, and the Ground Plan of Pharmacokinetics. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 1982, 10, 201—227.
64. Dorresteijn, G. M.; van Miert, A. S. J. P. A. M. Pharmacotherapeutic Aspects of Medication of Birds. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1988, 11, 33—44.
65. Calder, W. A., III Size, Function and Life History; Harvard University Press; Cambridge, MA, 1984.
66. Grondel, J. L.; Nouws, J. F. M.; Schutte, A. R.; Driessens, F. Comparative Pharmacokinetics of Oxytetracycline in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) and African Catfish (*Clarias Gariepinus*). *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1989, 12, 157—162.
67. Boxenbaum, H. Interspecies Variation in Liver Weight, Hepatic Blood Flow, and Antipyrine Intrinsic Clearance; Extrapolation of Data to Benzodiazepines and Phenytoin. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 1980, 8, 165—176.
68. Gaspari, F.; Bonati, M. Interspecies Metabolism and Pharmacokinetic Scaling of Theophylline Disposition. *Drug. Metab. Rev.* 1990, 22, 179—207.
69. Kleiber, M. Metabolic Turnover Rate; A Physiological Meaning of the Metabolic Rate Per Unit Body Weight. *J. Theoret. Biol.* 1975, 53, 199—204.
70. Landoni, M. F.; Soraci, A. L.; Delatour, P.; Lees, P. Enantioselective Behaviour of Drugs Used in Domestic Animals; A Review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1997, 20, 1—16.
71. Landoni, M. F.; Lees, P. Comparison of the Anti-Inflammatory Actions of Flunixin and Ketoprofen in Horses Applying PK/PD Modelling. *Equine. Vet. J.* 1995, 27, 247—256.
72. Landoni, M. F.; Comas, W.; Mucci, N.; Anglarilla, G.; Bidall, D.; Lees, P. Enantiospecific Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ketoprofen in Sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1999, 22, 349—359.
73. Landoni, M. F.; Cunningham, F. M.; Lees, P. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ketoprofen in Calves Applying PK/PD Modelling. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1995, 18, 315—324.
74. Landoni, M. F.; Lees, P. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ketoprofen Enantiomers in the Horse. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1996, 19, 466—474.
75. Landoni, M. F.; Lees, P. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ketoprofen Enantiomers in Calves. *Chirality* 1995, 7, 586—597.
76. Mauleon, D.; Mis, R.; Ginesta, J.; Ortega, E.; Vilageliu, J.; Basi, N.; Carganico, G. Pharmacokinetics of Ketoprofen Enantiomers in Monkeys Following Single and Multiple Oral Administration. *Chirality* 1994, 6, 537—542.
77. Rudy, A. C.; Liu, Y.; Brater, D. C.; Hall, S. D. Stereo-selective Pharmacokinetics and Inversion of (R)-ketoprofen in Healthy Volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 1998, 38, 3S—10S.
78. Aberg, G.; Ciofalo, V. B.; Pendleton, R. G.; Ray, G.; Weddle, D. Inversion of (R)-to (S)-Ketoprofen in Eight Animal Species. *Chirality* 1995, 7, 383—387.
79. Garcia, M. L.; Tost, D.; Vitageliu, J.; Lopez, S.; Car-



- ganico, G.; Mauleon, D. Bioavailability of S (+)-Keto-
profen After Oral Administration of Different Mixtures
of Ketoprofen Enantiomers to Dogs. *J. Clin. Pharma-
col.* 1998, 38, 22S–26S.
80. Hutt, A. J.; Caldwell, J. The Importance of Stereo-
chemistry in the Clinical Pharmacokinetics of the 2-Aryl-
propionic Acid Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs.
Clin. Pharmacokinet. 1984, 9, 371–373.
 81. Soraci, A. L.; Benoit, E.; Olivier, L.; Delatour, P. Com-
parative Metabolism of R (–)-Fenoprofen in Rats and
Sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1995, 18, 167–171.
 82. Soraci, A. L.; Benoit, E. In Vitro Fenopropheryl-Coen-
zyme A Thioester Formation: Interspecies Variations.
Chirality 1996, 7, 534–540.
 83. Benoit, E.; Soraci, A.; Delatour, P. Chiral Inversion as
a Parameter for Interspecies and Intercompound Discrep-
ancies in Enantiospecific Pharmacokinetics, 6th Interna-
tional Congress European Association for Veterinary
Pharmacology and Toxicology, Blackwell Scientific Pub-
lications: Edinburgh, 1994; S5/7, 07
 84. Hayball, P. J.; Meffin, P. J. Enantioselective Disposi-
tion of 2-arylpropionic Acid Nonsteroidal Anti-Inflamma-
tory Drugs. III. Fenoprofen Disposition. *J. Pharmacol.
Exp. Ther.* 1987, 240, 631–636.
 85. Rubin, A.; Knadler, M. P.; Ho, P. P. K.; Bechtol,
L. D.; Wolen, R. L. Stereoselective Inversion of (R)-
Fenoprofen to (S)-Fenoprofen in Humans. *J. Pharm.
Sci.* 1985, 74, 82–84.
 86. Berry, B. W.; Jamali, F. Presystemic and Systemic
Chiral Inversion of R (–)-Fenoprofen in the Rat. *J.
Pharmacol. Exp. Ther.* 1991, 258, 695–701.
 87. McKellar, Q. A.; Delatour, P.; Lees, P. Stereospecific
Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Carprofen in the
Dog. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1994, 17, 447–454.
 88. Lees, P.; McKellar, Q. A.; May, S. A.; Ludwig, B. M.
Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Carprofen in
the Horse. *Equine Vet. J.* 1994, 26, 203–208.
 89. Kemmerer, J. M.; Rubio, F. A.; McClain, R. M.; Ko-
echlin, B. A. Stereospecific Assay and Stereospecific
Disposition of Racemic Carprofen in Rats. *J. Pharm.
Sci.* 1979, 68, 1274–1280.
 90. Stoltenberg, J. K.; Puglisi, C. V.; Rubio, F.; Vane,
F. M. High-Performance Liquid Chromatographic Deter-
mination of Stereoselective Disposition of Carprofen in
Humans. *J. Pharm. Sci.* 1981, 70, 1207–1212.
 91. Lees, P.; Delatour, P.; Benoit, E.; Foster, A. P. Phar-
macokinetics of Carprofen Enantiomers in the Horse.
Acta. Vet. Scand. Suppl. 1991, 87, 249–251.
 92. Taylor, P. M.; Delatour, P.; Landoni, M. F.; Deal, C.;
Pickett, C.; Shojaee, Aliabadi F.; Foot, R.; Lees, P.
Pharmacodynamics and Enantioselective Pharmacokinetic
of Carprofen in the Cat. *Res. Vet. Sci.* 1996, 60,
144–151.
 93. Delatour, P.; Foot, R.; Foster, A. P.; Baggot, D.; Lees,
P. Pharmacodynamics and Chiral Pharmacokinetics of
Carprofen in Calves. *Br. Vet. J.* 1996, 152, 183–198.
 94. Muir, W. W.; Hubbell, J. A. Cardiopulmonary and An-
esthetic Effects of Ketamine and Its Enantiomers in
Dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1988, 49, 530–534.
 95. White, P. F.; Ham, J.; Way, W. L.; Trevor, A. J.
Pharmacology of Ketamine Isomers in Surgical Patients.
Anesthesiology 1980, 52, 231–239.
 96. Delatour, P.; Jaussaud, P.; Courtot, D.; Fau, D. En-
antioselective N-demethylation of Ketamine in the
Horse. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1991, 14, 209–212.
 97. Deleforge, J.; Davot, J. L.; Boisrame, B.; Delatour, P.
Enantioselectivity in the Anaesthetic Effect of Ketamine in
Dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1991, 14, 418–420.
 98. Caldwell, J. The Importance of Stereochemistry in Drug
Action and Disposition. *J. Clin. Pharmacol.* 1992, 32,
925–929.
 99. Foster, R. T.; Jamali, F. High-Performance Liquid
Chromatographic Assay of Ketoprofen Enantiomers in
Human Plasma and Urine. *J. Chromatogr.* 1987, 416,
388–393.
 100. Delatour, P.; Garnier, F.; Benoit, E.; Claude, I.
Chiral Behaviour of the Metabolite Albendazole Sulph-
oxide in Sheep, Goats and Cattle. *Res. Vet. Sci.*
1991, 50, 134–138.
 101. Pasutto, F. M. Mirror Images: The Analysis of Phar-
maceutical Enantiomers. *J. Clin. Pharmacol.* 1992,
32, 917–924.
 102. Carr, R. A.; Foster, R. T.; Lewanczuk, R. Z.; Hamil-
ton, P. G. Pharmacokinetics of Sotalol Enantiomers in
Humans. *J. Clin. Pharmacol.* 1992, 32, 1105–1109.
 103. Drayer, D. E. Pharmacodynamic and Pharmacokinetic
Differences between Drug Enantiomers in Humans: An
Overview. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1986, 40, 125–133.
 104. Monteiro-Riviere, N. A.; Bristol, D. G.; Manning,
T. O.; Rogers, R. A.; Riviere, J. E. Interspecies and
Interregional Analysis of the Comparative Histologic
Thickness and Laser Doppler Blood Flow Measure-
ments at Five Cutaneous Sites in Nine Species. *J. In-
vest. Dermatol.* 1990, 95, 582–586.
 105. Riegelman, S. Pharmacokinetics: Pharmacokinetic Factors
Affecting Epidermal Penetration and Percutaneous Absorp-
tion. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1974, 16, 873–883.
 106. Montagna, W. Comparative Anatomy and Physiology

S

- of the Skin. *Arch. Dermatol.* 1967, 96, 357—363.
107. Pitman, I. H.; Rostas, S. J. Topical Drug Delivery to Cattle and Sheep. *J. Pharm. Sci.* 1981, 70, 1181—1193.
108. Ryder, M. L. A Survey of the Follicle Populations in a Range of British Breeds of Sheep. *J. Agric. Sci.* 1957, 49, 275—284.
109. Forsyth, B. A.; Gibbon, A. J.; Pryor, D. E. Seasonal Variations in Anthelmintic Response by Cattle to Dermally Applied Levamisole. *Aust. Vet. J.* 1983, 60, 141—146.
110. Idson, B. Vehicle Effects on Percutaneous Absorption. *Drug Metab. Rev.* 1983, 14, 207—222.
111. McKenzie, A. W. Percutaneous Absorption of Steroids. *Arch. Dermatol.* 1962, 86, 91—94.
112. Barry, B. W. Properties that Influence Percutaneous Absorption. *Dermatological Formulations; Percutaneous Absorption*; Marcel Dekker, Inc. New York, 1983, 127—233.
113. Gyrð-Hansen, N.; Brimer, L.; Rasmussen, R. Percutaneous Absorption and Recovery of Parathion in Pigs. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 1991, 87, 410—412.
114. Scheuplein, R. J. Site Variations in Diffusion and Permeability. In *The Physiology and Pathophysiology of the Skin*; Jarrett, A., Ed.; Academic Press: New York, 1978; 5, 1731—1752.
115. McCreesh, A. H. Percutaneous Toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1965, 7 (Suppl. 2), 20—26.
116. Monteiro-Riviere, N. A.; Stromberg, M. W. Ultrastructure of the Integument of the Domestic Pig (*Sus scrofa*) from one through Fourteen Weeks of Age. *Zbl Vet Med [Reihe C]* 1985, 14, 97—115.
117. Bartek, M. J.; LaBudde, J. A.; Maibach, H. I. Skin Permeability In Vivo: Comparison in Rat, Rabbit, Pig and Man. *J. Invest. Dermatol.* 1972, 58, 114—123.
118. Riviere, J. E.; Monteiro-Riviere, N. A. The Isolated Perfused Porcine Skin Flap as an In Vitro Model for Percutaneous Absorption and Cutaneous Toxicology. *Crit. Rev. Toxicol.* 1991, 21, 329—344.
119. Riviere, J. E.; Monteiro-Riviere, N. A.; Williams, P. L. The Isolated Perfused Porcine Skin Flap as an In Vitro Model for Predicting Transdermal Pharmacokinetics. *Eur. J. Pharmac. Biopharmac.* 1995, 41, 152—162.
120. Wester, R. C.; Maibach, H. I. Regional Variation in Percutaneous Absorption. *Percutaneous Absorption*; Bronaugh, R. L., Maibach, H. I., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1999; 107—116.
121. Behrendt, H.; Korting, H. Ch.; Braun-Falco, O. Zum Metabolismus von Pharmaka in der Haut. *Hautarzt* 1989, 40, 8—13.
122. Riviere, J. E.; Chang, S. K. Transdermal Penetration and Metabolism of Organophosphate Insecticides. In *Organophosphates; Chemistry, Fate and Effects*; Academic Press: New York, 1992.
123. Kao, J.; Carver, M. P. Cutaneous Metabolism of Xenobiotics. *Drug Metab. Rev.* 1990, 22, 363—410.
124. Ademola, J. I.; Chow, C. A.; Wester, R. C.; Maibach, H. I. Metabolism of Propranolol During Percutaneous Absorption in Human Skin. *J. Pharm. Sci.* 1991, 82, 767—770.
125. Ward, S.; Walle, T.; Walle, K.; Wilkinson, G. R.; Branch, R. A. Propranolol's Metabolism is Determined by Both Mephenytoin and Debrisoquin Hydroxylase. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1989, 45, 72—78.
126. Dorman, D. C.; Buck, W. B.; Trammel, H. L.; Jones, R. D.; Beasley, V. R. Fenvalerate/N, N-Diethyl-*m*-Toluamide (DEET) Toxicosis in Two Cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1990, 196, 100—102.
127. Mount, M. E.; Moller, G.; Cook, J.; Holstege, D. M.; Richardson, E. R.; Ardans, A. Clinical Illness Associated with a Commercial Tick and Flea Product in Dogs and Cats. *Vet. Human. Toxicol.* 1991, 33, 19—27.
128. Munro, D. D.; Stoughton, R. B. Dimethylacetamide (DMAC) and Dimethylformamide (DMFA): Effect on Percutaneous Absorption. *Arch. Dermatol.* 1965, 92, 585—586.
129. Kyles, A. E.; Papich, M.; Hardie, E. M. Disposition of Transdermally Administered Fentanyl in Dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1996, 57, 715—719.
130. Holley, F. O.; van Steennis, C. Postoperative Analgesia with Fentanyl: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Constant-Rate IV and Transdermal Delivery. *Br. J. Anaesthesia.* 1988, 60, 608—613.

(李瑞新 译)

树状大分子

Antony D'Emanuele

David Attwood

Ragheb Abu-Rmaileh

University of Manchester, Manchester, U.K.

引言

树状大分子是一种高度分枝的大分子，按结构分为三个部分：树状单元核心、树状单元内部以及树状单元表面修饰基团。20 世纪 80 年代早期，Tomalia 等拟定了术语 dendrimers^[1]，源自希腊单词 dendron（树枝）以及 meros（部分），这些聚合物的结构是对称枝状。树状大分子通过

重复反应逐步合成，产生相同分子的不同的代数，决定了分子的大小和表面功能基团。树状大分子的微环境有一些有趣的特性。核心结构内部的空穴和分枝结构的可折叠性质形成一些笼形结构和通道，这些笼形结构和通道既有亲水性又有憎水性，这取决于树状大分子的构造。树状大分子还具有一些特殊结合位点，通过修饰其表面基团以适应特殊用途。因此，树状大分子的结构可以控制一些性质，如形态、大小、密度、极性、反应性和溶解性。图 1 为第

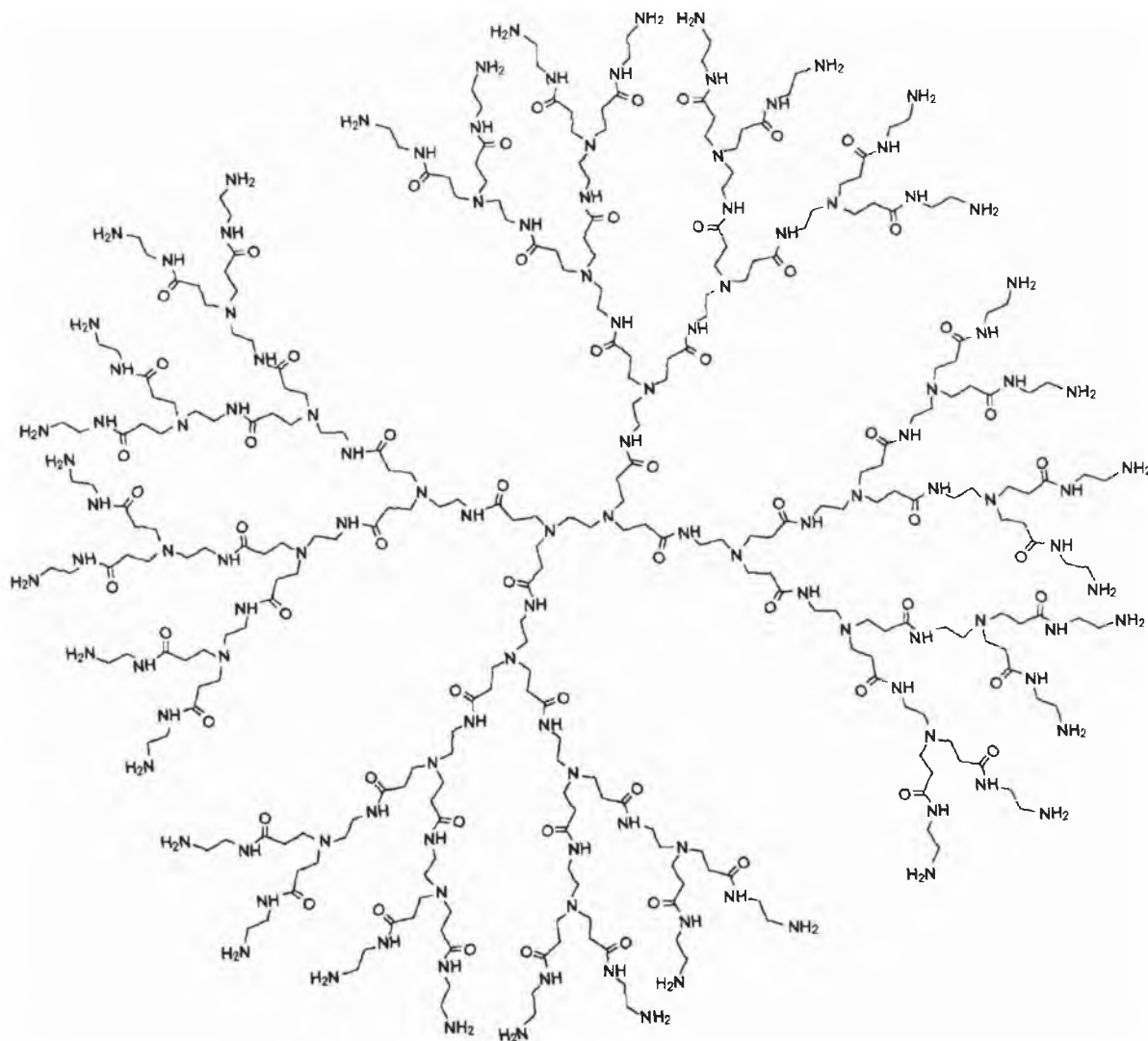


图 1 第三代聚酰胺-胺型 (PAMAM) 树状大分子的结构^[110]

S

三代聚酰胺-胺型(PAMAM) 树状大分子的结构。树状大分子可以非常大, 现已合成出直径超过 10nm 的 PAMAM 树状大分子。图 2 比较了一系列 PAMAM 树状大分子和大量生物结构的大小。表 1 列举了不同代的树状大分子与分子大小、相对分子质量和表面基团数量之间的关系^[2]。可以

看出, 树状大分子每升一代, 其表面基团的数量就翻一倍。

尽管早在 1978 年就有人描述过合成树状样结构的化合物^[3], 直到 20 世纪 90 年代以后, 人们才对这些聚合物产生了强烈兴趣, 这部分归因于可以通过商业途径获得 PAMAM 树状聚合物。

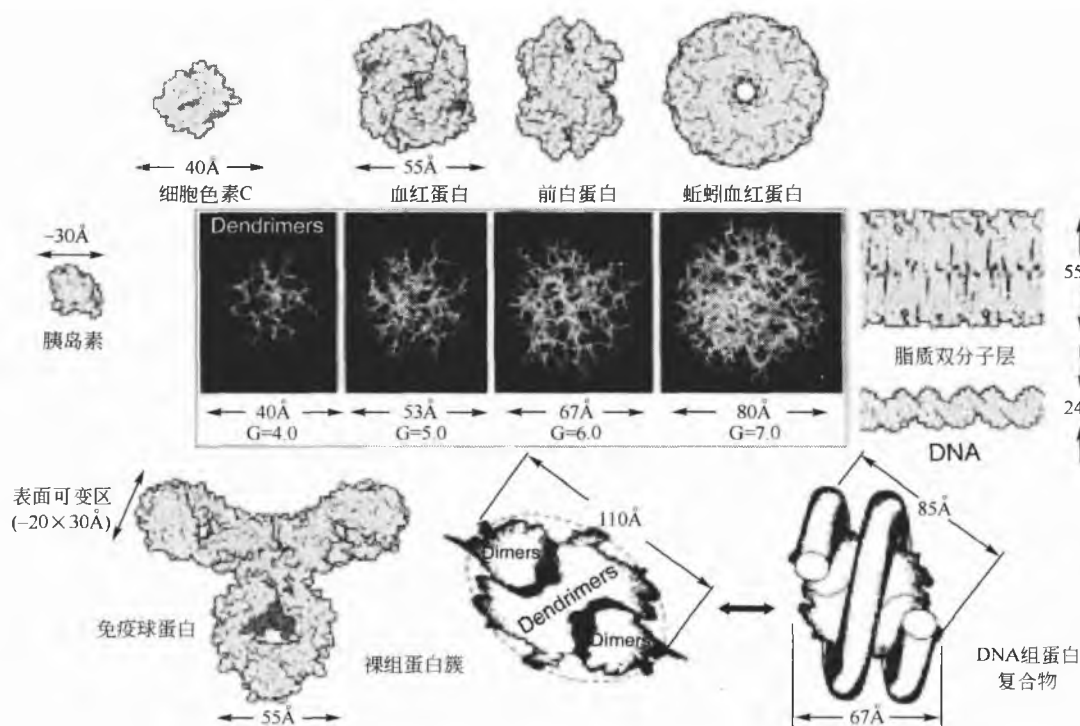


图 2 一系列 PAMAM 树状大分子 (NH_2 核心) 与多种蛋白质和生物组配体的大小比较^[7]

表 1 PAMAM 树状大分子的物理性质 (以 EDA 为核心)^[21]

代	相对分子质量	测量的直径/nm	表面基团
0	517	1.5	4
1	1430	2.2	8
2	3256	2.9	16
3	6909	3.6	32
4	14 215	4.5	64
5	28 826	5.4	128
6	58 048	6.7	256
7	116 493	8.1	512
8	233 383	9.7	1024
9	467 162	11.4	2048
10	934 720	13.5	4096

合成

树状大分子的制备有内向收敛法^[4~6]和支链歧化法^[1]两种方法, 大部分树状大分子的研究工作是基于可商业获得的 Starburst® PAMAM 树状聚合物, 它是通过氨基或乙二胺核 (EDA) 合成的, 具有酰胺-胺支链状结构。1985

年, Tomalia 等提出了这类树状大分子族, 通过支链歧化法制备得到, 该聚合物从中央核心分出许多分叉的树状结构。PAMAM 树状大分子通过重复步骤合成, 包括两步反应: Michael 加成再酰化反应。首先重复这两步反应生成零代树状大分子 (G_0); 接着, 每一个加成酰化不断循环增长从而形成更高的代系 (图 3), 这一循环合成过程最终形成一个完整的树状大分子 (以氨基为末端)。Michael 加成反应后, 终止反应则形成半代树状大分子 (以羧基为末端)。树状大分子的增长是一个自我限制的过程, 引入众多的表面基团, 其空间位阻会控制其增长^[8,9]。内向收敛合成法首先合成树状大分子的支链, 然后通过组装形成树状大分子。内向收敛法生成的是多分散性较低的系统, 而支链歧化法生成的树状结构由于反应不完全缺陷较多^[10]。然而支链歧化法的优点在于能够生成高代系树状大分子。Dykes 综述了树状大分子的合成方式以及各自的优点^[11]。

树状大分子一般都有三个结构部分: 一个核心单元、外周基团以及连接二者的多支链单元。核心单元作为以共价键连接树枝的楔 (树枝丛) 通常是一个非常重要的部分。然而, 合成的树状核心却通过其表面的交联作用维持着整个树状结构的完整^[12]。

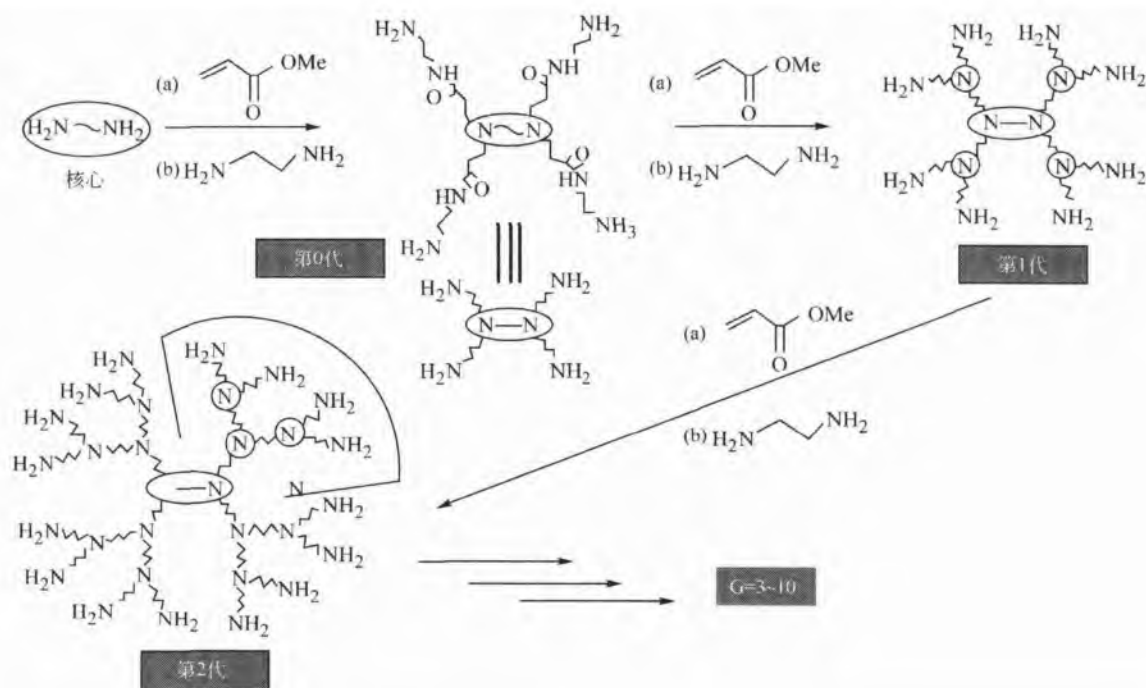


图3 PAMAM 树状大分子的合成消耗性的氨基基团与甲基丙烯酸酯的 Michael 加成, 生成的酯然后与 EDA 酰胺化^[7]

传统上要制备结构完美的树状大分子不仅需要不断重复偶合和活化, 而且需要广泛地纯化, 所以非常消耗时间^[13]。PAMAM 树状大分子仅仅是合成的数种药用树状大分子中的一种, Hawker 和 Fréchet 合成了聚芳基醚树状大分子, 它是单分子胶束和抗癌药物结合物的基础^[4,14,15]。Wang 等^[16]报道了合成聚苯乙烯和聚苯醚 (PBE) 树状大分子通过氢键包合苯甲胺客分子。Jansen 等^[17]描述了合成以聚丙烯亚胺为基础的树状大分子用于包合客分子。人们合成了众多其他树状大分子族, 并且有广泛的用途^[18~20]。

有人报道了几种多肽类树状大分子^[21~25], 其主要应用之一就是制备多抗原多肽 (MAPs)。例如, Tam 利用聚赖氨酸平台技术制备了一个多抗原多肽^[26]。这些多肽用于激活机体免疫系统, 使机体产生大量的抗多肽抗体, 应用这些多肽可以避免免疫遗传性疾病以及传统抗原系统带来的缺陷。

确定树状大分子的结构通常要用到不同的技术, 包括核磁共振的¹H 谱和¹³C 谱、质谱、分子排阻色谱、高效液相色谱、电泳、元素分析和热分析等^[14,27~35]。

理化性质

和经典的高分子不同的是, 树状大分子具有分子均匀性高、相对分子质量分布窄、特定的大小和形状特征, 以及高度功能化的末端表面。这种分枝状的结构会形成一个大的三维球形结构, 如果相对分子质量够大时则会形成球体。线形高分子经常会自然卷曲, 并且在不同的溶剂中可能会有不同的构象, 而树状大分子与之明显不同, 它们的

结构相对固定。

从树状大分子分子模型的成长过程来看, 它的许多理化性质, 至少在定性上是可以预测的。就 PAMAM 树状大分子而言, 完整的树状大分子结构至少在 1.5 代时才呈现, 直到此时树状大分子才具有三个结构成分: 核心、内部以及分枝表面单元。从只有少量分枝结构发展为完整的树状结构的转变被认为是一个支链化的关键发展阶段^[36]。由于树状大分子渐进的成长模式, 可以以精确的方式制备, 半径线性增加, 我们可以制备高代系的树状分子。然而, 随着树状大分子代系的生长, 其表面单元成等几何级数放大, 很明显这种理想的增长不可能是无限制的, 必然存在一个临界代系, 这一临界代系的树状大分子反应表面将没有足够的空间去容纳新的单元。这一阶段被认为是 de Gennes 密集-充填状态, PAMAM 树状大分子第七代就属于这一状态^[37]。超过这一状态, 树状大分子当然还是能够继续增长的, 但是由于空间位阻效应, 树状大分子的表面基团不能全部参与反应, 这必然会影响树状大分子结构的完美。这种有缺陷的代系被称为“毛发形树状大分子”。

另外, 聚醚树状大分子的同样分子模型的三维特征显示, 表面分枝的原子空间拥挤状态限制其发展成为第四代。因此, 可以预测, 聚醚型树状大分子比 PAMAM 树状大分子更密集, 内部孔隙更少。PAMAM 树状大分子比聚醚型树状大分子具有更多的内部表面空间和溶剂充填体积。对于 PAMAM 树状大分子球形形状而言, 当代系超过第四代时, 溶剂可到达的表面区域随着代系的增加而增长, 所以分子内部表面区域所占溶剂可到达表面区域的比例也随之增长, 第四代大约为 29%, 第五代约为 69%, 第六代为

124%^[37]。因此,到第六代时,内表面积超过外表面积。对于聚醚型树状大分子来说,其内部表面区域在第三代和第四代时即达到最大值(20%)。这些内部孔隙可以键合或包合小分子,与脂质体药物输送系统相类似。

1. 树状大分子的大小和形状

计算机模拟的 PAMAM 树状大分子的结构模型^[37~39],说明了外部形状随着代系增加的变化(图 2),这一连续变化是从早期代系的开放式无定形形状,发展到复杂的类球形网络(零代到三代),然后在第三代以后发展为完整的结构。这些形状变化是原子的空间位阻对不断增长的支链作用的结果。在图 4 中,这些形状的变化用相应的最长轴和最短轴之比来表示。目前,用实验方法确定树状大分子的精确形状有些困难,主要是因为大部分常用的技术在该尺度范围内均为其测定极限。

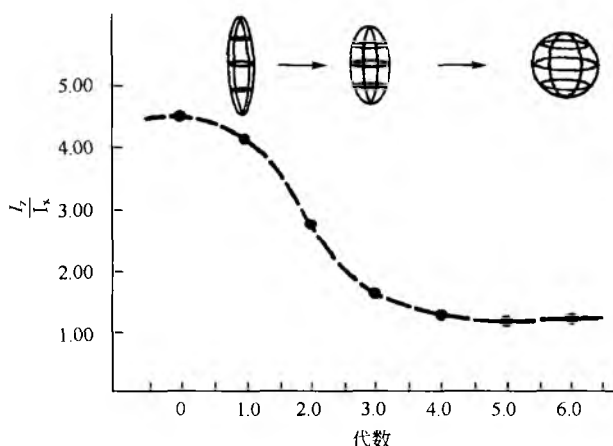


图 4 比较了 PAMAM 树状大分子形态学的变化 (L_z/L_x) 与代数的关系^[37]

文献中很少有用透射电子显微镜 (TEM) 观测树状大分子的照片,这可能是因为其尺度范围和脆弱的有机组成使利用电子束技术来观测非常困难^[40]。树状大分子的高品质图像只能通过观测其实际均匀性、球形和高分子的空隙来获得。Tomalia^[1]等利用 TEM 研究了 PAMAM 树状大分子,显示其是高度单分散的球体。例如,第 3.5 代 PAMAM 树状大分子的钠盐的图像通过计算机模拟测定,几乎 90% 的颗粒的直径波动范围在平均值的 10% 以内。Jackson 等^[41,42]利用该技术检测了第五代到第十代经过阳性着色的 PAMAM 树状大分子。研究结果显示,从第七代到第十代的分子为球形,部分分子带有“边”,而第五代到第六代分子的分辨率较低,这是因为小分子着色较少的缘故。利用 TEM 测得的树状大分子的平均直径与用小角 X 射线散射技术 (SAXS) 测出的平均直径能很好地吻合。

有人用原子力显微镜 (AFM) 研究了树状大分子在不同物体 (包括玻璃^[43]、石墨^[43,44] 以及具有电荷的固体^[45,46]) 表面的树枝状结构。Zhang 等^[47]报道了利用非接触的 AFM 技术研究单个的聚苯基树状大分子以及其聚集体

在云母表面的形状,发现它们能够很好地保持各自的立体形状。观测所得的高度与通过模拟分子动力学计算出的分子大小一致。另外,利用脉冲力模式 AFM 研究了单个树状大分子在云母表面的硬度和黏性,这些性质与树状大分子的分子结构和其外表面的化学性质有关。

利用分子排阻色谱和黏度测定方法^[37,39],测定以氨基或乙二胺为核心的 PAMAM 树状大分子水动力半径。研究结果表明,自第三代以后,其水动力半径随着代系的增加而线性提高。测量值介于理论计算的最大值和最小值之间,最大值是由于所有支链都有最大程度的延伸,而最小值只计算充填在内核外围的部分原子单元。展开的树状大分子被认为是同理想溶液一起出现的;利用小角度中子散射技术 (SANS) 研究溶剂性能对第五代和第八代 PAMAM 树状大分子的分子大小的作用^[48,49],结果表明,当溶剂性能下降时, PAMAM 树状大分子的旋转半径大约减少了 10%。同样的研究表明,当温度范围在 -10~50℃ 波动时,这两种树状大分子的旋转半径稳定在 5% 以内。

利用超滤手段小心去除助长剂和搭桥剂,可以获得 PAMAM 树状大分子的单分散样品。采用不同的测定技术,主要是分子排阻色谱和低角度激光散射^[37]、SANS 和 SAXS^[50,51] 以及特性黏度测定^[39],显示 PAMAM 树状大分子的多分散指数在 1.01~1.08,表明了 PAMAM 树状大分子在溶液中的分子大小是以单分散形式分布的。利用 SAXS 技术在稀甲醇溶液中测定从第三代到第十代 PAMAM 树状大分子和伯胺制成的以二氨丁烯为核心 [DAB-dendr-(NH₂)_x, x=16、32、64] 的聚丙烯亚胺树状大分子,均观察到相似的单分散性^[52]。相反,在稀溶液中多羟基的支链高分子显示出分散性,表明其内部片断的密度和总体大小的内在不规则性,从而得到更分散的溶液。Topp^[53]等报道了利用 SANS 测定在甲醇溶液具有较宽浓度范围的链末端为伯胺的聚丙烯亚胺树状大分子 (DAB-dendr(PA)₃₂ 和 DAB-dendr(PA)₆₄) (质量比从 0.01~0.80)。当聚丙烯亚胺树状大分子的溶液浓度低于临界浓度时,树状大分子的膨胀体积比低于 0.64 (树状大分子球形完全充填的临界体积分数),临界浓度对应的树状大分子的质量比为 0.25,这时树状大分子在溶液中像分散的均一软球体,不同树状大分子的片断相互之间不会交叉渗透。然而,当浓度再高一点时,树状大分子便会“塌陷”,随着树状大分子数量密度的增加,它们的体积在减小,因此溶液的体积分数依然保持在大约 0.64。

2. 树状大分子的表面性质

树状大分子的表面性质与组成其表面的末端功能基团特定相关,这些基团要么能起反应,要么为被动的部分,或者兼而有之。这些功能基团的类型和数量以及它们的电离状况能够以各种方式影响树状大分子溶液的性质,如改变溶解度、聚集程度以及不同树状大分子内部的电荷相互作用。一个树状大分子的表面可以包括许多同样的特定功

能基团,这对于底物结合非常有利。当表面基团电离后,它就成为一个高分子电解质,可以与其他带相反电荷的粒子发生强烈的相互作用。高分子电解质的树状大分子除了能与蛋白质和DNA结合外,还能被不同的界面强烈吸附,如氧化铝-水界面以及硅-水界面^[54~57]。

尽管可以合成具有不同种类的功能基团的树状大分子,但是研究最多的还是胺基和羧基。以0.2mol/L HCl滴定第四代PAMAM树状大分子2%的水溶液,其滴定曲线有两个明显的拐点:第一个拐点表明可滴定的末端伯氨基(pK_a 10.7);另一个拐点则为内部的氨基(pK_a 6.5)。利用¹³C化学位移可以确定树状大分子的滴定特征^[1]。通过第四代PAMAM树状大分子的滴定曲线算出其表面电势为63mV^[58]。

3. 电荷作用和聚集

在树状大分子的水溶液中,pH和添加的电解质都能显著影响树状大分子可电离基团的电荷相互作用。Briber等^[50]利用SANS和SAXS技术研究了PAMAM树状大分子的浓溶液中分子之间的相互作用。他们的研究表明,加入过量的酸和电解质可以使这些大分子产生不同强度的相互作用。他们利用SANS技术手段,采用D₂O检测了电离程度和溶剂pH对聚丙烯亚胺树状大分子[DAB-dendr-(NH₂)₆₄]结构性质的影响^[59,60]。当加入盐酸时,树状大分子发生电离,并且在静电排斥作用下分子空间排列呈现相应的分散单峰。在非电离状态下,这些树状大分子像“柔软”的分子,弹性很好,在高浓度时可能会相互缠绕。然而,当它们电离时,静电力使它们的支链拉伸,降低了它们的弹性,所以它们像“硬”的颗粒。

Chen等^[61]利用极性-反应探针研究了pH滴定对第六代PAMAM树状大分子结构的影响,他们提出了两种可能的模型用以解释树状大分子的行为。第一种模型假定树状大分子的末端在所有碱性pH中是向内折叠的,使其内部极性轻微下降。在高pH时(pH为10),质子化作用只发生在极性更大的表面氨基上;当pH降至8.3时,极性稍低的氨基开始质子化,并且整体环境的极性降低,符合实验观测结果。最后,随着pH的进一步降低,内部氨基质子化,并且在电荷的排斥作用下整个分子伸展。在第二种模型中,提高树状大分子末端的质子化程度能够克服系统熵,迫使带电荷的末端基团向外围分布,表面基团的拥挤使观测到的环境的极性降低。在这个模型中,随着pH下降至8.3,密度较低、极性较高的内部氨基开始质子化,使整个环境极性升高。第一种模型是将第六代PAMAM树状大分子看做一个紧密的核,而第二种是将其看做一个具有紧密外壳的模型。

Nurse等^[35]详细研究了第五代PAMAM树状大分子的水溶液的理化性质,发现氨基表面(G5-NH₂)的树状大分子的理化性质与羟基表面(G5-OH)树状大分子的理化性质不同。G5-OH树状大分子在稀溶液中的水动力性质表现为一个个单一类球体,其摩尔质量与理论预测值相当,

水动力半径大约为3.1nm。相反,利用分子排阻色谱和超速离心沉降平衡方法对G5-NH₂树状大分子进行研究,研究结果显示,它在溶液中表现为寡聚集体,即便在高浓度的盐溶液中也是如此。通过测量G5-NH₂树状大分子在pH 7.2的磷酸盐缓冲溶液中的沉降与其浓度的关系,结果发现,当G5-NH₂树状大分子浓度足够高时,静电排斥作用会明显掩盖住微弱的相互间的吸引力,从而形成非特性的聚集体。

Milhem^[58]进行的静态和动态光散射研究表明,第四代PAMAM树状大分子在pH 10.5的水溶液中即使浓度高达7%也不会形成分子间的聚集体,甚至在pH 14完全电离时也是如此。

4. 内部结构

树状大分子的许多可能的应用直接依赖于其内部片断密度的组织和分布,以及降低内核密度的可能性。de Gennes和Hervet^[8]首次从理论上研究了氨基末端的PAMAM树状大分子的内部结构,预测其组成片断的分布是外周紧密、内部是一个相对中空的核心。另外,Lescanec和Muthukumar^[62]利用Monte Carlo模拟预测其是一个中间密度最大边缘塌陷的分子。两种模型都有缺陷;de Gennes模型不能解释回折现象,从而无法正确地预测弹性树状大分子的性质,而Lescanec和Muthukumar模型是基于动力学生长而不是结构的平衡。这些模型的预测数据与通过各种技术测定的实验数据进行了比较。

Prosa^[52]利用SAXS技术研究从第三代到第十代的PAMAM树状大分子的甲醇溶液。研究结果显示,低代系的树状大分子的密度比高代系的树状大分子的密度要低,但是最初的几代系以后,它们的平均密度与其代系没有直接关系,整个结构均匀,靠近内核的树状大分子的密度没有降低(第十代树状大分子),这与de Gennes模型的预测值相反。

对PAMAM树状大分子的分子密度^[39]和特性黏度^[37,39]的测定显示,随着代系的改变,这些性质会有一些不寻常的变化。研究发现,第四代PAMAM树状大分子分子密度最低,但特性黏度最大,这暗示在溶剂填充的分子内自由体积中完全展开的树状大分子具有很容易受影响的内表面,分子内自由体积可由内部空穴和通道组成。Mo-urey等^[63]对PBE单支链化合物(基于二羟基苯甲醇)和通过将支链化合物利用内向收敛法与一个三功能的内核1,1,1-三(4'-羟基苯)乙烷偶合制成的三支链化合物的研究发现了同样的现象。研究结果显示,第三代三支链化合物和第五代单支链化合物具有最高特性黏度,与Lescanec和Muthukumar模型预测的支链向内折叠相吻合;中部密度最大,整个结构分布着末端基团。如果这些表面基团之间没有特定的相互作用以及这些支链有足够的弹性的话,就会逐步向内折叠,那么,为保持结构平衡从而使中部密度最大也就比较合理了,这是因为对于分子来说具有最大熵,能减少末端基团的拥挤。这个模型还有一个显著意义,就

S

是它不仅能描述 PAMAM 树状大分子, 还能描述聚醚类树状大分子, 这就意味着它可能对所有弹性树状大分子具有普遍适用性。

Scherrenberg^[64]等研究了最初五代聚丙烯亚胺树状大分子 DAB-dendr-(NH₂)_x 和 DAB-dendr-(CN)_x, ($x = 4, 8, 16, 32, 64$) 在稀溶液中 (D₂O, 1%) 的分子特征, 提出了树状大分子支链向内折叠的程度。与用分子动力学计算出的结果相比, 表明聚丙烯亚胺树状大分子可以看成是具有相对均匀密度分布的弹性树状大分子, 而与 de Gennes 模型或 Lescanec 和 Muthukumar 模型都不吻合。

通过各种技术得到的相当多的证据显示, 树状大分子模型的结构是由一个相对柔软的内部和包裹一层相当坚硬的分子表面基团的外围组成, 即所谓的“树状盒子”^[17]。利用¹³C 核磁共振测定特殊标记的 PAMAM 树状大分子的弛豫时间^[65-68], 结果显示外围表面基团的流动性比内部的要小得多。Meltzer^[65, 66]等利用¹³C 核磁共振弛豫时间研究羟基末端的 PAMAM 树状大分子, 目的是为了了解末端基团对分子链动力学的影响 (0.5 代到 10.5 代)。每个末端基团的碳的弛豫时间 (T_1) 随着代系的增加而缩短, 这意味着基团的运动严格地限制在高代系的树状大分子的表面。因此, 可以得出的结论是通过重复分支链来形成的 PAMAM 树状大分子的结构, 与树状大分子模型演示的增长过程一样, 必然会在某一点上原子的空间排列达到饱和, 无论是在分子表面, 还是贯穿整个分子体积。然而值得注意的是, 树状大分子末端基团的活动灵活性比预计区域的可能要大。因此, 一种可能是, 由于分子增长的不完全, 末端基团的数量比预期的要少; 另一种可能是, 由于支链能够向分子内部折叠, 末端基团并没有完全处于分子的表面。Gorman 等^[69]还指出, 第三代树状大分子的一些末端基团 (大约 3 个) 非常靠近分子内核, 在分子几何外围发现的末端基团中, 平均每 32 个末端基团中有 25 个末端基团的活动灵活性比其他部位的末端基团的活动灵活性要好。

对于 NH₂ 内核、EDA 内核^[39]的一系列 PAMAM 树状大分子, PBE 和以酚封端的聚酯类^[27]进行差示扫描量热测定。结果显示, 树状大分子的玻璃化转变温度随着相对分子质量的增加而成指数提高, 在大约第三代或第四代时达到平衡。这些结果表明, 在树状大分子的内部空间有显著的片断运动, 很可能就在核的周围, 利用¹³C 核磁共振弛豫时间对第二代或三代系树状大分子研究的结果支持上述结论。此外, 在内核的周围第五层支链层, 与玻璃化转变温度相关的片断运动达到极限值, 不能再进一步延伸。

5. 树状大分子的流动性和相互作用

树状大分子溶液的流动性不仅显示了它在药剂学上的应用可能性, 而且还可以通过其了解树状大分子之间相互作用的本质。通过计算机模拟的低代系树状大分子的形状模型可知, 具有一个“碟状”或“屋顶状”实体, 相邻的树状大分子的支链容易插入其内部。两个相互穿透的分子

内部的氨基基团之间形成的氢键、一个分子的伯氨基基团与另一个分子的酰胺羰基氧之间形成的氢键, 会使这一现象加剧。相反, 高代系的树状大分子封闭的外表面不会引起分子之间的相互作用。

Uppuluri 等^[36]利用锥板旋转流变计测定前七代的 EDA-核 PAMAM 树状大分子在中浓度和高浓度的溶液中 (在 30%~75% EDA 中) 的切变力和张力, 研究结果显示它们是典型的牛顿流体。零剪切变黏度的 log 值与平均相对分子质量的对数值的关系曲线斜率没有突变, 显示即使是在相互作用应该很明显的高浓度溶液中, 树状大分子并没有显著的相互作用以便能形成类网状。对线性聚氨基胺的测定显示出它的独特的本体流动性, 与相应相对分子质量的单链大分子相似, 也显示了与支链开始缠绕有关的曲线变形。这些树状大分子和球形颗粒的胶体混悬液的流动性有着本质的不同, 典型的不同是, 当超过临界的剪切速率、相对分子质量或浓度时, 胶体混悬液会出现由于单个颗粒聚集的趋势造成的。剪切变稀的性质, 树状大分子溶液的黏度比那些相同相对分子质量、相同浓度的链型大分子溶液至少低一个数量级, 它们更容易流动。可以认为, 与其他合成的相同相对分子质量的大分子相比, 树状大分子的这一非典型流动性质是由其独特的树状结构造成的, 当树状大分子高于临界代系以后, 形成完整的球体, 外部表面基团紧紧贴于自身, 至少在密度上使其他树状大分子或高分子不能穿透, 从而产生这些溶液的牛顿流体性质。普通长链大分子随着链长度的增加, 链之间纠缠的可能性也增加, 而树状大分子的情形与它们相反。通过观测, 发现树状大分子的黏度对温度很敏感, 其溶液的稳定性对反复混合也很敏感, 这就意味着树状大分子的内部有令人惊讶的弹性, 其膨胀^[70]和收缩能力^[71]依赖于溶剂性质、溶液浓度和温度, 这与报道的相一致。这些观察到的现象支持了树状大分子的一个模型, 即具有柔软或海绵样的内部和密度更高、更加拥挤的外壳。

对前八代 PAMAM 树状大分子进行详细的流变学检测^[72], 如在很大的温度范围内测定树状大分子的稳定切变、塑流切变以及动力学摆动切变, 探索其本体 (不是溶液) 的流变行为。从单个松弛模型到多个松弛模型的显著变化, 是第四代树状大分子符合 Maxwell 型行为, 这与柔软内部-紧密外壳的模型相一致, 包括其外部基团紧密贴于自身也相一致。此外, 通过分析 PAMAM 树状大分子的自由体积, 发现其依赖于树状大分子的代系, 这与通过上述模型预测的第四代 PAMAM 树状大分子定性构象变化相一致。

通过测量 PBE 单树枝型和三树枝型熔融黏度以进一步探求树状大分子的表面性质^[73]。熔融黏度与相对分子质量的对数曲线成线性, 斜率与整体预测值接近, 没有观测到受支链纠缠的影响。从这些观察到的现象可以确定, 树状大分子的熔融黏度与支链的纠缠无关, 而是与一个高度枝化的球体行为相一致, 这是由于这一状态加剧了分子表面的拥挤, 减少了分子之间支链的纠缠。

树状大分子的药学应用

1. 通过树枝大分子包含和增溶药物

Maciejewski 在 1982 年提出了用特殊的蛋壳状结构包裹客分子的概念^[74]。利用树状大分子包含或不稳定、溶解度不高的药物相互作用,以保护药物或增加生物利用度,引起了人们极大的兴趣。这种客分子-主分子树状大分子系统还可作为药物输送系统。在树枝状结构中包含药物有多个术语,通常这些系统的树状结构只有细微差别。客分子与树状大分子的相互作用可能只是简单的物理包含,或者可能是特殊的憎水作用或氢键。

以前描述过树状大分子作为一个单分子胶束^[14,15,75~79],其结构包括一个憎水内核和一个亲水的表面层。然而,与传统的胶束不同的是,其树状结构与树状大分子的浓度无关,因此,它们不具有临界胶束浓度。Newkome 等描述了一个层叠状的单分子胶束,由新戊基内核和 36 个羧酸表面基团组成^[77]。利用亲脂性探针(如酚蓝)发现了其与直径为 3~5nm 的胶束的亲脂性部分结合。Hawker 等描述了树

枝状聚醚单分子胶束的收敛合成法,它是由羧酸酯表面基团和 3,5-二羟基苯乙醇组块构成^[14]。调整该树状胶束分子的内含位点,以进行特殊的非键合作用(在这个例子里是 $\pi\pi$ 作用)。这种电荷丰富的大分子(图 5)能够增溶不同种类的多环芳香族化合物,其增溶能力随着树状大分子浓度和多环芳香族化合物的电荷密度的增加而增大。有人描述了杂化树状结构,在这个球状结构上,亲水性基团和憎水性基团分别隔离在特定的区域,这样,在这种界面上便具有一定的定位性。基于 3,5-二羟基苯乙醇结构的树状大分子,由于内部具有小空腔使其具有有限的增溶能力。Liu 等合成了水溶性的基于 4,4-(4'-羟基苯基)戊醇组块和聚乙二醇(PEG)链的表壳结构的树状单分子胶束^[15,32]。为提高树状结构的弹性,增加其空腔的体积,必须选择好建造组块,而选择 PEG 是由于它具有良好的水溶性和已知的生物相容性(图 6)。单分子胶束能增加苾在水中的溶解度(在水中的溶解度提高约 365 倍),包含模型药物(吡啶美辛)的浓度为 11% (w/w) (第三代树状大分子胶束),此值相当于每个胶束分子大约包含 9 个药物分子。包含吡啶美辛的树状大分子可以在 30h 内起到缓释作用。

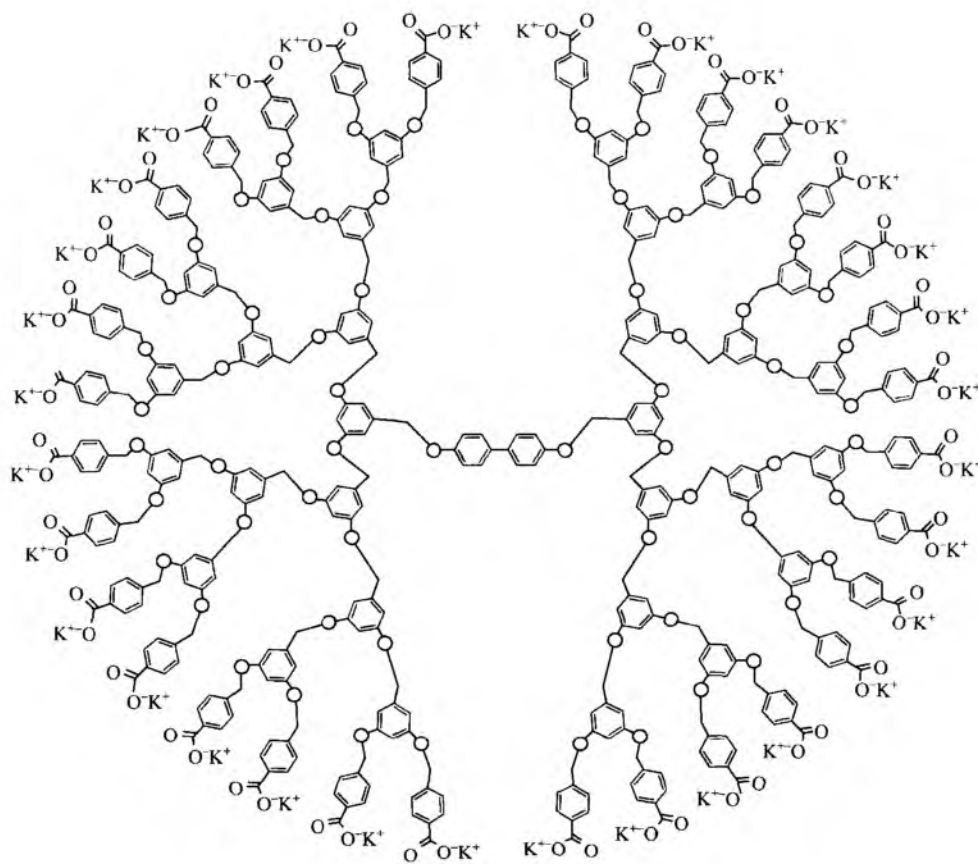
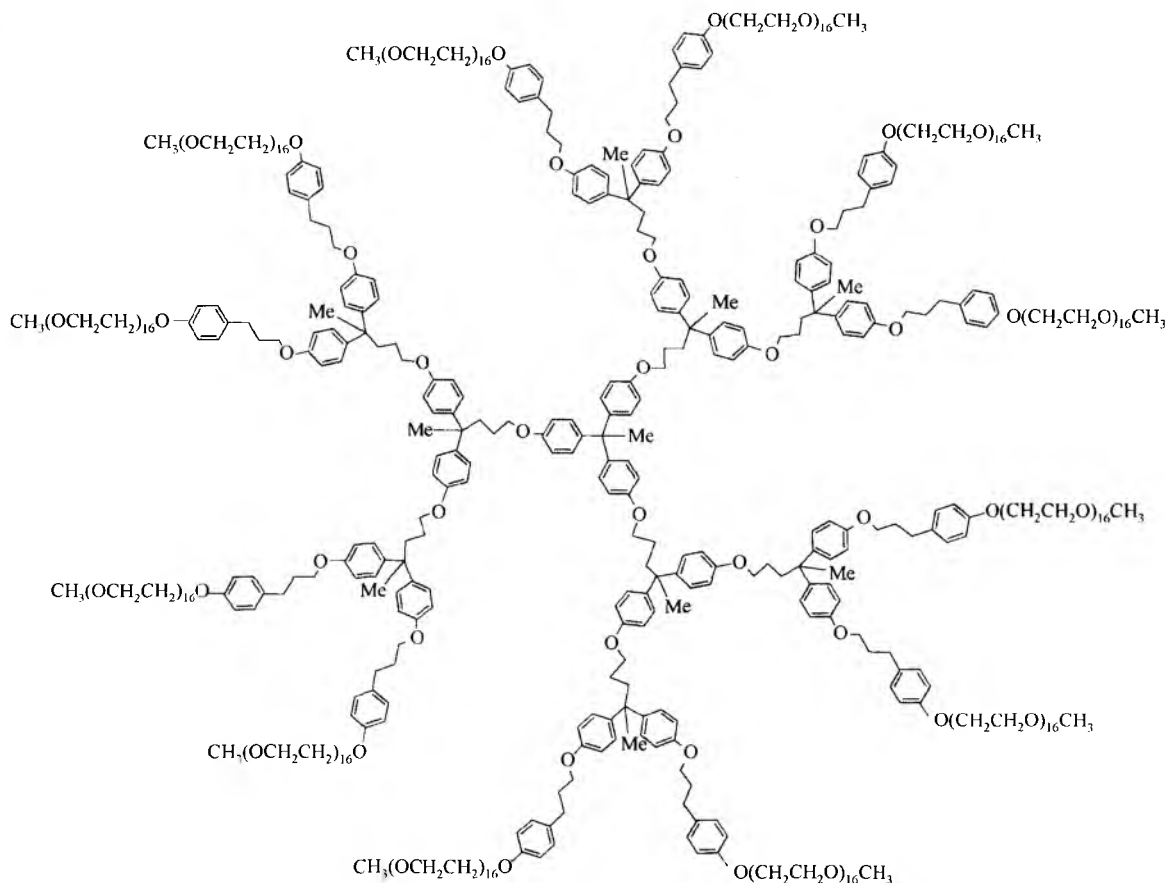


图 5 水溶性单分子树状聚醚胶束^[14]

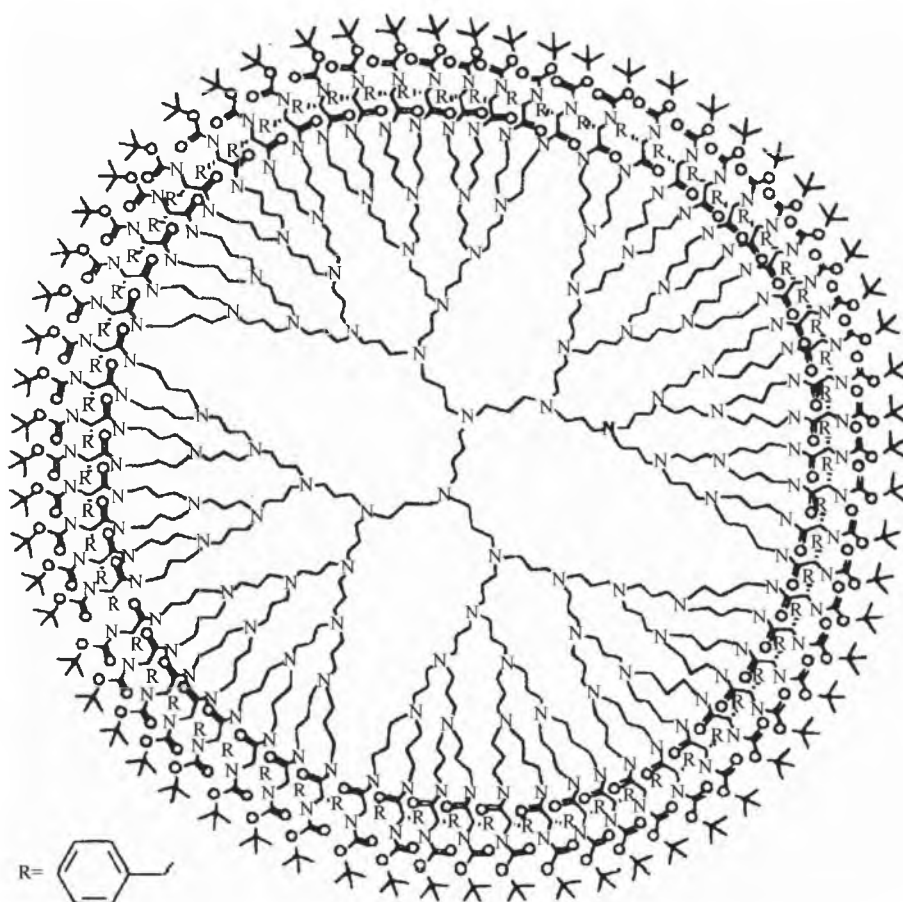
图6 二代树状单分子胶束^[15]

Jansen 等描述了一个树状盒子包含分子的作用^[17,80~82], 这一树状结构以聚丙烯亚胺为内核, 带有一个手性外壳以保护氨基酸(图7)。这种树状分子结构, 大小为 5nm, 拥有一个密集的外壳(因为大量的表面基团), 表现为固体的特征。客分子包裹进树状大分子的内部空腔。即使是溶剂萃取、长时间加热和超声后, 密集的外壳仍可以阻止客分子从树状盒子中向外的扩散。包含效果只见于高代系的树状大分子, 如一个具有 64 个氨基末端基团的树状大分子包含了超过四个玫瑰红分子。这项研究的进一步工作就是从树状盒子中, 根据客分子的形状选择性地释放药物^[81]。用甲酸水解包含有玫瑰红分子和 4-硝基苯酸分子的树状结构盒子的表面 *t*-Boc 基团, 使树状大分子发生穿孔, 只能释放 4-硝基苯酸, 不能释放玫瑰红。由于玫瑰红分子比较大, 只能用 12mol/L 的盐酸回流 2h, 水解掉树状大分子的外壳后才能被释放出来。

为提高树状结构的载药率, 一个途径是移去树状大分子的内核, 增加内腔空间, 产生所谓的去核树状大分

子^[12,83]。很明显, 这个途径需要一个能够保持去核树状大分子的结构完整性的方法, 以保持树状楔之间的联结的完整。Zimmerman 小组采用的途径是在移走内核之前, 通过环合转换反应, 广泛地交联树状大分子的表面基团(图8)。通过断开三个酯键, 移走内核, 这样, 由于酯键连接的稳定作用, 整个结构不受影响。与中空的大分子纳米粒相似, 去核树状大分子具有包合物质的能力。然而, 我们并不清楚它们是怎样包裹客分子的。

近来, 一篇树状结构包含药物的研究报告, 提出了两种可能的系统, 即 Dendriloek[®] 型结构和 Dendripore[®] 型结构^[84]。Dendriloek[®] 型结构是树状大分子拥有一个拥挤的外壳, 客分子的释放非常缓慢难以测定或根本就不存在。Dendripore[®] 型结构是一些低代系的树状主分子结构, 其表面基团还没有那么拥挤, 能够时间依赖性地释放客分子。这种模型的释放机制与 Meijer's 小组^[17,80~82] 报道的研究结果相同, 树状大分子表面基团的密度是控制客分子释放的手段。

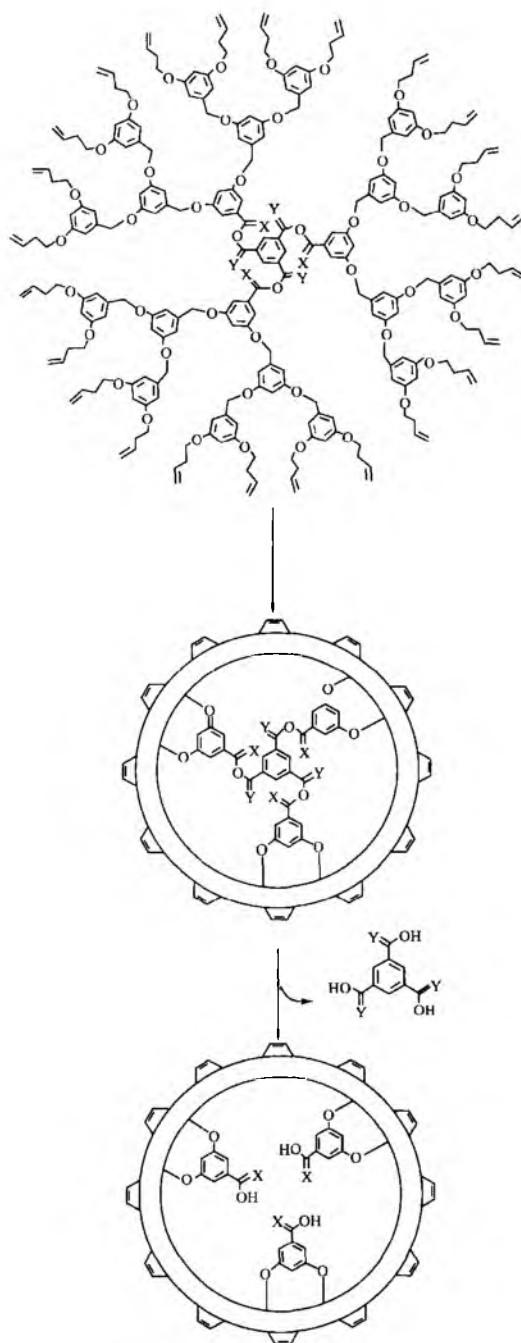
图7 基于聚丙烯酰胺树状大分子的树状盒子^[81]

Kojima 等通过 PEG 嫁接合成了第三代和第四代 PAM-AM 树状大分子, 并且检测了它们包合憎水分子, 如阿霉素和甲氨蝶呤的能力^[85]。据报道, 通过把 PEG 嫁接到每一个表面基团来改良 PAMAM 树状大分子, 这样能使树状大分子的水动力活动直径提高到 14.7nm。嫁接的目的是为了提高树状大分子的生物相容性和改善生物分布。据研究发现, 通过提高树状大分子的大小以及嫁接的 PEG 链的长度, 可以提高其载药量, 这样, 一个树状大分子可以包合超过 6.5 个阿霉素分子或包合超过 26 个甲氨蝶呤分子。尽管有迹象表明, 在低离子强度的水溶液中, 树状大分子载体对甲氨蝶呤具有控制其缓慢释放的能力, 但在等张溶液中它没有这种能力。

尽管树状大分子能够包合的客分子数量依赖其结构的有限区域, 但是通过客分子在树状大分子的表面与大量的表面基团形成复合物, 可以显著提高树状大分子的载药能力。带电荷的树状大分子与带相反电荷的高分子电解质之间的相互作用会使树状大分子生成可溶性的复合物^[86~91]。研究难溶药物与树状大分子的相互作用后, 发现树状大分子能够显著提高难溶药物的溶解度^[92~95]。例如, 2% (质量浓度) 第四代 PAMAM 树状大分子溶液能够使布洛芬的溶解度提高 140 倍, 是在 2% (质量浓度) 十二烷基硫酸钠

胶束溶液中溶解度的 2 倍多。这种树状分子-药物复合物被认为是由于布洛芬的羧基基团和树状大分子的表面氨基基团的静电引力的作用而形成, 近年来的研究指出, 这种作用力还包括内部氨基基团的参与^[58]。这种由于静电引力而生成的复合物有利于增加药物的溶解度, 但是却不能有效控制药物的释放^[93]。为了提高对药物的释放控制, 合成了具有能够与药物分子共价键合的表面基团的树状大分子, 从而使疏水药物布洛芬与第四代 PAMAM 树状大分子的表面偶合^[58,96,97]。研究还发现, 当与树状大分子表面结合的布洛芬分子数大于 5 时, 就会形成不溶性复合物。然而, 如果 PEG 链与树状大分子结合时, 则能够使树状大分子的载药量达到更高 (每个树状大分子装载超过 32 个布洛芬分子)。

该研究还检测了布洛芬从树状大分子复合物中的释放。Liu 等^[32]专门研究大量的能够与很多模型药物 (胆固醇和二氨基酸衍生物) 复合的聚醚树状大分子。在树状大分子表面嫁接短链 PEG 分子, 从而能够保持这些复合物的溶解度。Zhuo 等合成了与 PAMAM 树状大分子相似的枝状结构的树状大分子, 用 1,4,7,10-四氮杂环十二烷作为环形核^[34], 这种树状大分子能够从内核分出四个分枝, 使 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 与树状大分子发生表面键合, 通过复合物

图8 核心树状大分子的合成^[12]

水解而释放药物。

2. 树状大分子的摄取

药物的大分子载体，如树状大分子，在到达靶点前，必须穿过不同的细胞屏障，诸如上皮细胞和内皮细胞。当考虑穿过肠细胞膜时，透上皮的转运就是一个很重要的因素，而透内皮的转运与载体穿过血管到达靶细胞或受体的运动有关。一般来说，通过生物屏障的转运决定于所转运物质的性质（例如，药物分子、高分子和粒子）和屏障的

性质。载体的重要特性是相对分子质量、电荷、疏水性、弹性以及分子的几何形状。生物屏障的性质包括屏障的位置和功能。例如，分子透过血脑屏障的能力就小于透过肠上壁细胞的能力。

提出的一些树状结构在胃肠道里的摄取机制包括肠细胞吸附和内存、肠巨噬细胞的多细胞转运和摄取以及内脏淋巴组织的摄取^[98]。Wiwattanapatapee 等^[99]研究了直径为3~7nm的阴、阳离子型 PAMAM 树状大分子横穿翻转的大鼠肠壁系统。研究结果发现，PAMAM 树状大分子的摄取最可能通过跨细胞转运。他们还报道了阳离子 PAMAM 树状大分子（全部代系）能在组织中保留，这种保留作用是由于细胞膜表面负电荷对正电荷 PAMAM 树状大分子（包括其他带正电的聚合物）的吸附作用而产生的，Katchalsky^[100]也发现了这种保留作用。研究还发现阴离子 PAMAM 树状大分子具有很高的浆膜转运速率，因此其拥有作为口服药物输送系统的潜力。

Florence 和同事研究了表面被脂质修饰的第四代聚赖氨酸树状大分子（直径为5nm）口服给药后的摄取状况^[98,101]。体内研究表明，胃肠道对树状大分子的摄取非常迅速，证明了其作为特殊输送系统的潜力。据发现，在胃肠道中的这种摄取形式并不是相同的，在小肠内树状大分子可以通过淋巴组织摄取，但是在大肠中没有这种摄取作用。小肠中的集合淋巴结优先吸附树状大分子穿越肠壁细胞，在大肠中则没有这种情形发生。树状大分子的摄取水平低于已展示的粒径在50~3000nm的聚苯乙烯粒子的摄取水平。这就意味着内脏对纳米粒摄取时，要求纳米粒有一个最佳的大小值，因此减小纳米粒的大小并不一定会增加它的摄取量。

Tajarobi 等^[102]研究了一系列完整代系的 PAMAM 树状大分子（第一代到第四代）穿越 Madin-Darby 犬的肾（MDCK）细胞的情形。据发现，树状大分子对细胞的穿透力的顺序为 $G_4 \gg G_1 > G_0 > G_3 > G_2$ ，穿透力的大小受制于树状大分子的大小与细胞相互作用之间的平衡。第四代 PAMAM 树状大分子拥有较高的穿透力的一个影响因素是它能够保持细胞的完整。Zhang 和 Smith^[103]还指出更高代系的 PAMAM 树状大分子可能会干扰或影响细胞的完整性。

El-Sayed 等^[104]报道了 PAMAM 树状大分子穿过内皮网状毛细血管外渗的影响因素。其得出的结论是，这种穿越速率除了取决于 PAMAM 树状大分子的理化性质，如几何形状和电荷外，还取决于其分子的大小和相对分子质量。提高 PAMAM 树状大分子的大小会相应地引起外渗时间指数增加。阳离子 PAMAM 树状大分子与带负电的细胞壁相互作用也会引起外渗时间的增加。在生理 pH 条件下，电荷与几何形状之间的平衡，可以由阳离子 PAMAM 树状大分子的外渗速率远快于中性具有相同大小的 PEG 分子来证明。

当树状大分子与标记物结合后，需要谨慎地判读其摄取数据。Yoo 和 Juliano 等使用荧光染色（Oregon Green

488) 标记的树状大分子, 发现其对抗敏感化合物的转运效果比未被修饰的树状大分子要好^[105]。当存在多分散性时要充分研究树状大分子的性质, 这一点对于高代系的树状大分子来说显得尤为重要^[103, 104]。

3. 利用树状大分子转运 DNA 和寡核苷酸

树状大分子显示出作为 DNA 的有效载体用于转染细胞^[29, 106~115]。Haensler 和 Szoka^[106]的研究证明了利用质粒-PAMAM 树状大分子复合物可以有效转染由混悬或黏附培养出来的哺乳动物细胞。通过控制不同复合物的大小以及质粒/PAMAM 树状大分子的比率, 可以获得最大转染值。将膜去稳定多肽与树状大分子联结后, 发现表达不受脂质营养因素的影响, 转染率可提高两个数量级。树状大分子的高转染率被认为与其大小、形状以及它所具有的缓冲内质体中 pH 变化的能力有关。还发现树状大分子对细胞具有很好的忍受力, 其毒性比聚赖氨酸要低。像树状大分子这样的阳离子聚合物是作为浓缩 DNA 的载体而发挥作用(其直径与染色质内的组氨酸核的直径相类似, 为 7nm)。这种现象的内在效应是由于净正电荷的 DNA-阳离子聚合物联合体与细胞表面的负电荷基团相互作用的结果。Kukowska-Latallo 等^[107]报道了与聚赖氨酸相似的树状大分子作为载体对细胞的更高水平的转染能力。值得注意的是, 不同类型的树状大分子对不同类型细胞进行特定转染, 这依赖于细胞对 DNA-树状大分子复合物的代谢机制。研究还发现脂质营养对转染有益。Haensler 和 Szoka 两人早期用购买的树状大分子产品进行转染研究, 得出的转染水平不同, 可能是因为他们所用的产品不纯。Szoka 小组^[29]随后的研究报道指出, 单分散 PAMAM 树状大分子只能产生低水平的转染率, 而部分降解的 PAMAM 树状大分子却可以产生很高水平的转染率(>50 倍)。降解的 PAMAM 树状大分子组分(断裂的树状大分子)所具有的高水平转染活性是由于其原子的空间排列不是很拥挤造成。由于断裂树状大分子的树枝状支链的舒展性增加, 其与 DNA 分子连接时更为压缩, 在细胞中释放 DNA 分子时能够变得膨胀。树状大分子转染的效率与其他种类的阳离子聚合物基因载体相比较, 降解的树状大分子由于其相对较低的细胞毒性而具有较高的转染活性^[116]。将 PEG 连接在低代系的 PAMAM 树状大分子上, 则比降解的 PAMAM 树状大分子具有更高的转染效率^[115]。研究认为连接于树状大分子上的 PEG 链类似于断裂的高代系树状大分子的基本特性(提高了链的舒展性)。应用连接有 PEG 链的低代系树状大分子还能提高其生物相容性。

树状大分子已成功应用于反义寡核苷酸(ODNs)的药物输送系统^[105, 117~120]。Hughes 等^[117]利用无毒浓度的第五代 PAMAM 树状大分子提高反义寡核苷酸的效力。Bielinska 等^[118]报道了利用 PAMAM 树状大分子提高反义寡核苷酸和反义 cDNA 质粒在体外细胞培养系统中的活性。研究结果认为树状大分子可以提高 ODN 转运进入细胞。通过静电作用将磷脂 ODN 连接于树状大分子上还能延长它们在细

胞内的存活时间。据报道, 作为 ODN 有效载体的一定浓度的树状大分子必须是无细胞毒性的。

4. 基于树状大分子平台的癌症治疗

为检测树状大分子作为药物输送载体以治疗不同种类的肿瘤进行了许多研究。第一种途径是提高药物与肿瘤组织定位结合的穿透效力和滞留效力(EPR 效力)^[121]。第二种途径是将载药树状大分子结合半靶点, 如抗体或受体的特异性分子(配体), 从而使其定位于肿瘤的特定细胞。从结构上来说, 多分枝的树状大分子与其他活性大分子一样可以在它们的表面或内部装载相对较多的药物, 它们也是单分散系统, 复合物的大小可以相对精确地计算出来。

顺铂是一种很重要的抗癌药物, 但是和其他铂类抗癌药物一样, 它的溶解度很低, 具有很多严重的副作用, 并且许多肿瘤有内在的或获得性的耐药性。Malik 等利用具有羧基表面的第 3.5 代 PAMAM 树状大分子与顺铂连接, 得到了树状大分子-铂类药物复合物, 载药量很高(约 25%), 溶解度很高, 能在体外缓慢释放顺铂^[122]。体内研究表明, 小鼠腹腔内给予树状大分子-顺铂药物复合物和顺铂, 它们对荷 L1210 肿瘤小鼠活性相同, 而仅有树状大分子-顺铂药物复合物能够对荷 B16F10 肿瘤小鼠有活性。静脉给药治疗明显的皮下黑素瘤时, 树状大分子-顺铂药物复合物显示有活性, 而顺铂无活性。树状大分子-顺铂药物复合物由于滞留效应在固体肿瘤组织中选择性地聚集, 同时这种联合体还能明显降低顺铂的毒性。

Kono 等^[123]报道了合成聚醚的树状大分子, 联结甲氨蝶呤或叶酸残基, 这种复合物以几乎所有实体瘤细胞中都能过度表达的叶酸受体为靶点。Wiener 等^[124]利用联结有叶酸的 PAMAM 树状大分子的复合物靶向治疗肿瘤, 这种复合物能够表现出以受体特异性的方式在细胞中聚集。

其他的例子还出现在与抗体结合的用于肿瘤靶向治疗的树状大分子中(尤其是 PAMAM 树状大分子)。Barth 等^[125]合成了硼化的 PAMAM 树状大分子, 将其结合在 IB16-6 单克隆抗体上, 直接用于鼠 B16 黑色素瘤的治疗。这种复合物被设计成硼化中子捕获治疗的体系。这种免疫复合物在体外表现出高水平的免疫活性, 而在体内只在肝和脾中有活性。该小组将表皮生长因子(EGF)结合在硼化的第四代 PAMAM 树状大分子上可用于靶向治疗脑肿瘤^[125]。当神经鞘内给予这种复合物时, 能够选择性地被输送到 EGF 受体神经胶质瘤中, 而静脉给予这种复合物则再一次定位于肝和脾中, 很少能够穿过血-脑屏障。Abu-Rmaileh 等提出将载药树状大分子结合抗体碎片专门定位靶向于能生成癌胚抗原的肿瘤细胞中^[127]。这种复合物如果在其表面嫁接 PEG 链, 则会降低内皮网状系统的摄取。Kobayashi 等^[128]证明了将单克隆抗体结合在树状大分子上, 会使免疫活性降低。他们还有许多关于树状大分子-抗体复合物在免疫测定中的应用的报道^[129, 130]。

Baker 等讨论了智能纳米装置治疗系统用于诊断和治疗

癌症的技术要求,并提出了两种途径^[131]:第一种途径是在同一个树状大分子上结合所有具有特定功能的基团;第二种途径是构建一个包含许多树状大分子的簇丛,其中的每

一个树状大分子都有一个不同功能的基团(图9)。有人合成了一个第五代-叶酸-FITC荧光复合物成功靶向定位到能够表达叶酸受体的细胞株中。

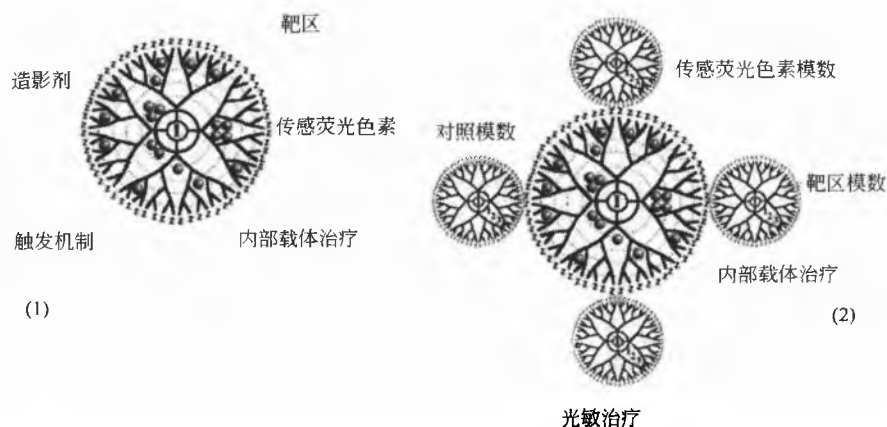


图9 树状纳米装置用于癌症治疗的两种设计方案。构型(1)是围绕单一树状分子设计的治疗药物(直径70Å);构型(2)是由多个树状分子簇集而成的簇状试剂,提供不同的功能单元(直径大约为200Å)。后者的优点是以组合方法混合和配比的功能单元适用于几乎所有的癌症治疗^[131]

5. 树状大分子的生物评价

虽然有很多树状大分子在药理学中的应用被提出,但是很少有证据表明树状大分子能够安全地用于人体。这可能一部分是由于评价这些材料很困难。关于树状大分子的科学现在所关心的是样品的纯度问题,但这并不是一个明确建立高代系树状大分子纯度的简单过程^[103,104]。很可能利用已知具有生物相容性和生物体内降解为自然代谢物的分子模块开发出新的树状大分子,如 Camahan 和 Grinstaff^[132]等描述的聚(甘油-琥珀酸)树状大分子。大量研究中包括了树状大分子的毒性和生物相容性^[99,102,106,107,115,117,125,126],但是只有两个报道明确致力于树状大分子的安全性问题的研究。Roberts 等^[133]研究了第三代、第五代和第七代 PAMAM 树状大分子的安全性问题。这些树状大分子在 V79 细胞和 Swiss-Webster 小鼠中测试了大量的生物学性质,包括毒性、免疫遗传性和生物分布。其结果是,只观察到高浓度的第七代 PAMAM 树状大分子的生物并发症。树状大分子的生物分布与其代系有关;第三代 PAMAM 树状大分子显示出在肾脏中的高度聚集,而第五代和第七代 PAMAM 树状大分子只分布在胰腺中。尽管得出的结论是,树状大分子没有显示出不能作为生物学应用的性质,但是对树状大分子制品的生物分布必须仔细评估。作者还指出树状大分子不纯(62.7%~76.7%)。Malik 等^[134,135]检测了具有二氨基丁烷核与二氨基乙烷核的 PAMAM 树状大分子和聚丙烯酰胺树状大分子以及嫁接了碳硅的聚氧乙烯树状大分子(Csi-PEO)的生物相容性,系统地检测了这些树状大分子的代系与表面功能基团对它们体外生物学性质的作用。据报道观测到了具有氨基表面基团的树状大分子浓度依赖的溶血性质和改变红细胞形态的性质。Csi-PEO 树状大分子和那些具有羧基末端的树状大

分子在体外对细胞株不具有溶血和细胞毒性。一般来说,阳离子树状大分子是具有细胞毒性的。对聚醚树状大分子的初步研究表明,具有羧基末端和丙二酸末端的树状大分子在 1h 内不具有溶血性质,但是与阴离子 PAMAM 树状大分子不同,它们在 24h 后会出现胞溶作用。对 Wistar 大鼠静脉给予¹²⁵I 标记的阳离子 PAMAM 树状大分子(第三代和第四代)后其能够被体循环迅速清除。阴离子 PAMAM 树状大分子(第 2.5 代、3.5 代和 5.5 代)具有更长的循环时间,其清除率取决于代系的高低。一般来说,低代系的 PAMAM 树状大分子具有较长的循环时间。高代系阳离子 PAMAM 树状大分子的内在毒性预示着它们不可能适用于注射给药,尤其是在剂量较大时。这些结果表明,如果树状大分子的目标是身体的其他部位的话,其结构必须仔细修饰以避免被肝脏迅速摄取。这些研究并没有考虑树状大分子的纯度问题。还不清楚这些报道的树状大分子的浓度是否具有临床相关性。上述两个方面的研究都评价了未修饰的树状大分子。然而基于树状大分子的药物输送系统(经过表面修饰和载药),其生物学性质可能会不同。DNA-PAMAM 树状大分子复合物还显示出比独立的树状大分子具有更小的肌蛋白毒性,可能是由于这些联结体减少了树状大分子过多的正电荷^[136]的缘故。还发现嫁接了 PEG 链的 PAMAM 树状大分子能够提高循环时间和改善生物分布,没有嫁接的则集中在肝和肾中^[137]。

结论

树状大分子是超枝化聚合物中独特的类别,它们具有非常精确的大小、形状和化学功能以及其他性质,这在别的线性和交联的聚合物中还没有发现过。在过去的 10 年里,树状大分子研究的许多领域都有显著的进展,部分归

因于一些树状大分子可以通过商业渠道获得,如 PAMAM 树状大分子;还由于一些新的树状结构被合成出来。已经提出了一些超枝化大分子的许多药理学应用,根据它们目前的发展速度来看,可以设想在下一个 10 年内,基于树状大分子的剂型将会出现。

参考文献

- Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* (Tokyo) 1985, 17, 117–132.
- EDA Core PAMAM Dendrimers in, <http://www.dendritech.com/pamam.html> (accessed April 2002).
- Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F. “Cascade”- and “Nonskid-Chain-Like” Syntheses of Molecular Cavity Topologies. *Synthesis* 1978, 155–158.
- Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. Preparation of Polymers with Controlled Molecular Architecture. A New Convergent Approach to Dendritic Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 7638–7647.
- Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. Control of Surface Functionality in the Synthesis of Dendritic Macromolecules Using the Convergent-Growth Approach. *Macromolecules* 1990, 23, 4726–4729.
- Grayson, S. M.; Fréchet, J. M. J. Convergent Dendrons and Dendrimers: From Synthesis to Applications. *Chem. Rev.* (Washington, DC) 2001, 101, 3819–3867.
- Esfand, R.; Tomalia, D. A. Poly (Amidoamine) (PAMAM) Dendrimers: From Biomimicry to Drug Delivery and Biomedical Applications. *Drug Discov. Today* 2001, 6, 427–436.
- de Gennes, P. G.; Hervet, H. Statistics of “Starburst” Polymers. *J. Phys. Lett.* 1983, 44, 351–360.
- Tomalia, D. A.; Hall, M.; Hedstrand, D. M. Starburst Dendrimers. III. The Importance of Branch Junction Symmetry in the Development of Topological Shell Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 1601–1603.
- Hummelen, J. C.; Van Dongen, J. L. J.; Meijer, E. W. Electrospray Mass Spectrometry of Poly (Propylene Imine) Dendrimers—The Issue of Dendritic Purity or Polydispersity. *Chem. Eur. J.* 1997, 3, 1489–1493.
- Dykes, G. M. Dendrimers: A Review of Their Appeal and Applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2001, 76, 903–918.
- Wendland, M. S.; Zimmerman, S. C. Synthesis of Cored Dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 1389–1390.
- Hecht, S.; Vladimirov, N.; Fréchet, J. M. Encapsulation of Functional Moieties Within Branched Star Polymers: Effect of Chain Length and Solvent on Site Isolation. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 18–25.
- Hawker, C. J.; Wooley, K. L.; Fréchet, J. M. J. Unimolecular Micelles and Globular Amphiphiles: Dendritic Macromolecules as Novel Recyclable Solubilization Agents. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* 1993, 1287–1297.
- Liu, M.; Kono, K.; Fréchet, J. M. J. Water-Soluble Dendritic Unimolecular Micelles: Their Potential as Drug Delivery Agents. *J. Control. Release* 2000, 65, 121–131.
- Wang, Y.; Zeng, F.; Zimmerman, S. C. Dendrimers with Anthryridine-Based Hydrogen-Bonding Units at Their Cores: Synthesis, Complexation and Self-assembly Studies. *Tetrahedron Lett.* 1997, 38, 5459–5462.
- Jansen, J. F. G. A.; de Brabander-van Den Berg, E. M. M.; Meijer, E. W. Encapsulation of Guest Molecules into a Dendritic Box. *Science* 1994, 266, 1226–1229.
- Bosman, A. W.; Janssen, H. M.; Meijer, E. W. About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications. *Chem. Rev.* (Washington, DC) 1999, 99, 1665–1688.
- Majoral, J. P.; Caminade, A. M. Dendrimers Containing Heteroatoms (Si, P, B, Ge, or Bi). *Chem. Rev.* 1999, 99, 845–880.
- Fischer, M.; Vögtle, F. Dendrimers: From Design to Application—A Progress Report. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 885–905.
- Denkewalter, R. G.; Kolc, J.; Lukasavage, W. J. Macromolecular Highly Branched Homogeneous Compound Based on Lysine Units. US Patent 4, 289, 872.
- Mulders, S. J. E.; Brouwer, A. J.; van der Meer, P. G. J.; Liskamp, R. M. J. Synthesis of a Novel Amino Acid Based Dendrimer. *Tetrahedron Lett.* 1997, 38, 631–634.
- Kim, Y.; Zeng, F.; Zimmerman, S. C. Peptide Dendrimers from Natural Amino Acids. *Chem. Eur. J.* 1999, 5, 2133–2138.
- Veprek, P.; Jezek, J. Peptide and Glycopeptide Dendrimers. Part I. *J. Pept. Sci.* 1999, 5, 5–23.
- Veprek, P.; Jezek, J. Peptide and Glycopeptide Dendrimers. Part II. *J. Pept. Sci.* 1999, 5, 203–220.
- Tam, J. P. Synthetic Peptide Vaccine Design: Synthesis and Properties of a High-Density Multiple Antigenic Peptide System. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85, 5409–5413.
- Wooley, K. L.; Hawker, C. J.; Pochan, J. M.; Fréchet, J. M. J. Physical Properties of Dendritic Macromolecules: A Study of Glass Transition Temperature. *Macromolecules* 1993, 26, 1514–1519.
- Mengerink, Y.; Mure, M.; de Brabander-van den Berg,

- E. M. M.; van der Wal, S. Exclusion Chromatography of Polypropylenamine Dendrimers. *J. Chromatogr. A* 1996, 730, 75—81.
29. Tang, M.; Redemann, C. T.; Szoka, F. C., Jr. In Vitro Gene Delivery by Degraded Polyamidoamine Dendrimers. *Bioconjug. Chem.* 1996, 7, 703—714.
30. Brothers, H. M., III. Piehler, L. T.; Tomalia, D. A. Slab-Gel and Capillary Electrophoretic Characterization of Polyamidoamine Dendrimers. *J. Chromatogr. A* 1998, 814, 233—246.
31. van der Wal, S.; Mengerink, Y.; Brackman, J. C.; de Brabander-van den Berg, E. M. M.; Jeronimus-Stratingh, C. M.; Bruins, A. P. Compositional Analysis of Nitrile Terminated Poly (Propylene Imine) Dendrimers by High-Performance Liquid Chromatography Combined with Electrospray Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1998, 825, 135—147.
32. Liu, M.; Kono, K.; Fréchet, J. M. J. Water-Soluble Dendrimer-Poly (Ethylene Glycol) Starlike Conjugates as Potential Drug Carriers. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 1999, 37, 3492—3503.
33. Yu, D.; Vladimirov, N.; Fréchet, J. M. J. MALDI-TOF in the Characterizations of Dendritic-Linear Block Copolymers and Stars. *Macromolecules* 1999, 32, 5186—5192.
34. Zhuo, R. X.; Du, B.; Lu, Z. R. In Vitro Release of 5-Fluorouracil with Cyclic Core Dendritic Polymer. *J. Control. Release* 1999, 57, 249—257.
35. Nourse, A.; Millar, D. B.; Minton, A. P. Physicochemical Characterization of Generation 5 Polyamidoamine Dendrimers. *Biopolymers* 2000, 53, 316—328.
36. Uppuluri, S.; Keinath, S. E.; Tomalia, D. A.; Dvornic, P. R. Rheology of Dendrimers. I. Newtonian Flow Behavior of Medium and Highly Concentrated Solutions of Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers in Ethylenediamine (EDA) Solvent. *Macromolecules* 1998, 31, 4498—4510.
37. Tomalia, D. A.; Naylor, A. M.; Goddard, W. A., III. Starburst Dendrimers: Molecular-Level Control of Size, Shape, Surface Chemistry, Topology and Flexibility in the Conversion of Atoms to Macroscopic Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1990, 29, 138—175.
38. Naylor, A. M.; Goddard, W. A., III. Kiefer, G. E.; Tomalia, D. A. Starburst Dendrimers. 5. Molecular Shape Control. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 2339—2341.
39. Tomalia, D. A.; Dvornic, P. R. Dendrimers. In *Polymeric Materials Encyclopedia*; Salamone, J. C., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 1996; 1814—1830.
40. Hudson, S. D.; Jung, H. T.; Percec, V.; Cho, W. D.; Johansson, G.; Ungar, G.; Balagurusamy, V. S. K. Direct Visualization of Individual Cylindrical and Spherical Supramolecular Dendrimers. *Science* 1997, 278, 449—452.
41. Jackson, C. L.; Chanzy, H. D.; Booy, F. P.; Tomalia, D. A.; Amis, E. J. Characterization of Dendrimer Molecules by Staining and Cryoelectron Microscopy Techniques. *Polym. Mater. Sci. Eng.* 1997, 77, 222—225.
42. Jackson, C. L.; Chanzy, H. D.; Booy, F. P.; Drake, B. J.; Tomalia, D. A.; Bauer, B. J.; Amis, E. J. Visualization of Dendrimer Molecules by Transmission Electron Microscopy (TEM): Staining Methods and Cryo-TEM of Vitrified Solutions. *Macromolecules* 1998, 31, 6259—6265.
43. Sheiko, S. S.; Eckert, G.; Ignat'eva, G.; Muzafarov, A. M.; Spickermann, J.; Raedar, H. J.; Moeller, M. Solid-like States of a Dendrimer Liquid Displayed by Scanning Force Microscopy. *Macromol. Rapid Commun.* 1996, 17, 283—297.
44. Huck, W. T. S.; Van Veggel, F. C. J. M.; Sheiko, S. S.; Moller, M.; Reinhoudt, D. N. Molecularly Thin Films of Metallodendrimers. *J. Phys. Org. Chem.* 1998, 11, 540—545.
45. Bliznyuk, V. N.; Rinderspacher, F.; Tsukruk, V. V. On the Structure of Polyamidoamine Dendrimer Monolayers. *Polymer* 1998, 39, 5249—5252.
46. Tsukruk, V. V.; Rinderspacher, F.; Bliznyuk, V. N. Self-Assembled Multilayer Films from Dendrimers. *Langmuir* 1997, 13, 2171—2176.
47. Zhang, H.; Grim, P. C. M.; Foubert, P.; Vosch, T.; Vanoppen, P.; Wiesler, U. M.; Berresheim, A. J.; Muellen, K.; De Schryver, F. C. Properties of Single Dendrimer Molecules Studied by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* 2000, 16, 9009—9014.
48. Bauer, B. J.; Topp, A.; Tomalia, D. A.; Amis, E. J. Effect of Solvent Quality on the Molecular Dimensions of PAMAM Dendrimers. *Polym. Mater. Sci. Eng.* 1998, 79, 312—313.
49. Topp, A.; Bauer, B. J.; Tomalia, D. A.; Amis, E. J. Effect of Solvent Quality on the Molecular Dimensions of PAMAM Dendrimers. *Macromolecules* 1999, 32, 7232—7237.
50. Briber, R. M.; Bauer, B. J.; Hammouda, B.; Tomalia, D. A. Small-Angle Neutron Scattering from Solutions of Dendrimer Molecules: Intermolecular Interactions. *Polym. Mater. Sci. Eng.* 1992, 67, 430—431.
51. Bauer, B. J.; Hammouda, B.; Briber, R. M.; Tomalia, D. A. SANS from Solutions of Large Dendrimer Molecules. *Polym. Mater. Sci. Eng.* 1993, 69, 341—342.
52. Prosa, T. J.; Bauer, B. J.; Amis, E. J.; Tomalia, D. A.; Scherrenberg, R. A SAXS Study of the Internal Struc-

- ture of Dendritic Polymer Systems. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* 1997, 35, 2913–2924.
53. Topp, A.; Bauer, B. J.; Prosa, T. J.; Scherrenberg, R.; Amis, E. J. Size Change of Dendrimers in Concentrated Solution. *Macromolecules* 1999, 32, 8923–8931.
 54. Esumi, K.; Gojino, M. Adsorption of Poly (Amidoamine) Dendrimers on Alumina/Water and Silica/Water Interfaces. *Langmuir* 1998, 14, 4466–4470.
 55. Kabanov, A. V.; Kabanov, V. A. DNA Complexes with Polycations for the Delivery of Genetic Material into Cells. *Bioconjug. Chem.* 1995, 6, 7–20.
 56. Ottaviani, M. F.; Sacchi, B.; Turro, N. J.; Chen, W.; Jockusch, S.; Tomalia, D. A. An EPR Study of the Interactions Between Starburst Dendrimers and Polynucleotides. *Macromolecules* 1999, 32, 2275–2282.
 57. Ottaviani, M. F.; Furini, F.; Casini, A.; Turro, N. J.; Jockusch, S.; Tomalia, D. A.; Messori, L. Formation of Supramolecular Structures Between DNA and Starburst Dendrimers Studied by EPR, CD, UV, and Melting Profiles. *Macromolecules* 2000, 33, 7842–7851.
 58. Milhem, O. M. An Investigation into the Potential Use of Polyamidoamine Dendrimers for Drug Delivery. Ph. D. Thesis, University of Manchester, Manchester.
 59. Ramzi, A.; Bauer, B. J.; Scherrenberg, R.; Joosten, J.; Amis, E. J. SANS Study of Fatty Acid Modified Dendrimers. *Polym. Mater. Sci. Eng.* 1998, 79, 382–383.
 60. Ramzi, A.; Scherrenberg, R.; Joosten, J.; Lemstra, P.; Mortensen, K. Structure-Property Relations in Dendritic Polyelectrolyte Solutions at Different Ionic Strength. *Macromolecules* 2002, 35, 827–833.
 61. Chen, W.; Tomalia, D. A.; Thomas, J. L. Unusual pH-Dependent Polarity Changes in PAMAM Dendrimers: Evidence for pH-Responsive Conformational Changes. *Macromolecules* 2000, 33, 9169–9172.
 62. Lescanec, R. L.; Muthukumar, M. Configurational Characteristics and Scaling Behavior of Starburst Molecules: A Computational Study. *Macromolecules* 1990, 23, 2280–2288.
 63. Mourey, T. H.; Turner, S. R.; Rubinstein, M.; Fréchet, J. M. J.; Hawker, C. J.; Wooley, K. L. Unique Behavior of Dendritic Macromolecules; Intrinsic Viscosity of Polyether Dendrimers. *Macromolecules* 1992, 25, 2401–2406.
 64. Scherrenberg, R.; Coussens, B.; van Vliet, P.; Edouard, G.; Brackman, J.; de Brabander-van den Berg, E. M. M.; Mortensen, K. The Molecular Characteristics of Poly (Propyleneimine) Dendrimers as Studied with Small-Angle Neutron Scattering, Viscosimetry, and Molecular Dynamics. *Macromolecules* 1998, 31, 456–461.
 65. Meltzer, A. D.; Tirrell, D. A.; Jones, A. A.; Inglefield, P. T.; Downing, D. M.; Tomalia, D. A. Carbon-13 NMR Relaxation in Poly (Amido Amine) Starburst Dendrimers. *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* 1989, 30, 121–122.
 66. Meltzer, A. D.; Tirrell, D. A.; Jones, A. A.; Inglefield, P. T.; Hedstrand, D. M.; Tomalia, D. A. Chain Dynamics in Poly (Amidoamine) Dendrimers; A Study of Carbon-13 NMR Relaxation Parameters. *Macromolecules* 1992, 25, 4541–4548.
 67. Ottaviani, M. F.; Bossmann, S.; Turro, N. J.; Tomalia, D. A. Characterization of Starburst Dendrimers by the EPR Technique. 1. Copper Complexes in Water Solution. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 661–671.
 68. Gopidas, K. R.; Leheny, A. R.; Caminati, G.; Turro, N. J.; Tomalia, D. A. Photophysical Investigation of Similarities Between Starburst Dendrimers and Anionic Micelles. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 7335–7342.
 69. Gorman, C. B.; Hager, M. W.; Parkhurst, B. L.; Smith, J. C. Use of a Paramagnetic Core to Affect Longitudinal Nuclear Relaxation in Dendrimers—A Tool for Probing Dendrimer Conformation. *Macromolecules* 1998, 31, 815–822.
 70. Uppuluri, S.; Tomalia, D. A.; Dvornic, P. R. A “Dense-Shell” Model for Intramolecular Morphology of Polyamidoamine Dendrimers Based on Experimental Rheological Data. *Polym. Mater. Sci. Eng.* 1997, 77, 116–117.
 71. Prosa, T. J.; Bauer, B. J.; Topp, A.; Amis, E. J.; Scherrenberg, R. Size Changes and Interpenetration Within Concentrated Dendrimer Solutions. *Polym. Mater. Sci. Eng.* 1998, 79, 307–308.
 72. Uppuluri, S.; Morrison, F. A.; Dvornic, P. R. Rheology of Dendrimers. 2. Bulk Polyamidoamine Dendrimers Under Steady Shear, Creep, and Dynamic Oscillatory Shear. *Macromolecules* 2000, 33, 2551–2560.
 73. Hawker, C. J.; Farrington, P. J.; Mackay, M. E.; Wooley, K. L.; Fréchet, J. M. J. Molecular Ball Bearings; The Unusual Melt Viscosity Behavior of Dendritic Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 4409–4410.
 74. Maciejewski, M. Concepts of Trapping Topologically by Shell Molecules. *J. Macromol. Sci. Chem.* 1982, A17, 689–703.
 75. Newkome, G. R.; Yao, Z.; Baker, G. R.; Gupta, V. K. Micelles. Part 1. Cascade Molecules; A New Approach to Micelles. A [27]-Arborol. *J. Org. Chem.* 1985, 50, 2003–2004.
 76. Tomalia, D. A.; Berry, V.; Hall, M.; Hedstrand, D. M. Starburst Dendrimers. 4. Covalently Fixed Unimolecular Assemblages Reminiscent of Spheroidal Mi-

- celles. *Macromolecules* 1987, 20, 1164—1167.
77. Newkome, G. R.; Moorefield, C. N.; Baker, G. R.; Saunders, M. J.; Grossman, S. H. Unimolecular Micelles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, 30, 1178—1180.
78. Stevelmans, S.; Hest, J. C. M. v.; Jansen, J. F. G. A.; Van Bortel, D. A. F. J.; de Berg, E. M. M.; Meijer, E. W. Synthesis, Characterization, and Guest-Host Properties of Inverted Unimolecular Dendritic Micelles. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 7398—7399.
79. Liu, M.; Fréchet, J. M. J. Preparation of Water-Soluble Dendritic Unimolecular Micelles as Potential Drug Delivery Agents. *Polym. Mater. Sci. Eng.* 1999, 80, 167—168.
80. Jansen, J. F. G. A.; de Brabander-van den Berg, E. M. M.; Meijer, E. W. The Dendritic Box and Bengal Rose. *Polym. Mater. Sci. Eng.* 1995, 73, 123—124.
81. Jansen, J. F. G. A.; Meijer, E. W.; de Brabander-van den Berg, E. M. M. The Dendritic Box: Shape-Selective Liberation of Encapsulated Guests. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 4417—4418.
82. Jansen, J. F. G. A.; Meijer, E. W.; de Brabander-van den Berg, E. M. M. Bengal Rose Dendritic Box. *Macromol. Symp.* 1996, 102, 27—33.
83. Schultz, L. G.; Zhao, Y.; Zimmerman, S. C. Synthesis of Cored Dendrimers with Internal Cross-Links. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 1962—1966.
84. Esfand, R.; Tomalia, D. A.; Beezer, A. E.; Mitchell, J. C.; Hardy, M.; Orford, C. Dendriopore and Dendriloock Concepts New Controlled Delivery Strategies. *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* 2000, 41, 1324—1325.
85. Kojima, C.; Kono, K.; Maruyama, K.; Takagishi, T. Synthesis of Polyamidoamine Dendrimers Having Poly (Ethylene Glycol) Grafts and Their Ability to Encapsulate Anticancer Drugs. *Bioconj. Chem.* 2000, 11, 910—917.
86. Li, Y.; Dubin, P. L.; Spindler, R.; Tomalia, D. A. Complex Formation Between Poly (Dimethyldiallylammonium Chloride) and Carboxylated Starburst Dendrimers. *Macromolecules* 1995, 28, 8426—8428.
87. Zhang, H.; Dubin, P. L.; Spindler, R.; Tomalia, D. Binding of Carboxylated Starburst Dendrimers to Poly (Diallyldimethylammonium Chloride). *Ber. Bunsen-Ges.* 1996, 100, 923—928.
88. Kabanov, V. A.; Zezin, A. B.; Rogacheva, V. B.; Gulyaeva, Z. G.; Zansochova, M. F.; Joosten, J. G. H.; Brackman, J. Interaction of Astramol Poly (Propyleneimine) Dendrimers with Linear Polyanions. *Macromolecules* 1999, 32, 1904—1909.
89. Miura, N.; Dubin, P. L.; Moorefield, C. N.; Newkome, G. R. Complex Formation by Electrostatic Interaction Between Carboxyl-Terminated Dendrimers and Oppositely Charged Polyelectrolytes. *Langmuir* 1999, 15, 4245—4250.
90. Zhang, H.; Dubin, P. L.; Ray, J.; Manning, G. S.; Moorefield, C. N.; Newkome, G. R. Interaction of a Polycation with Small Oppositely Charged Dendrimers. *J. Phys. Chem. B* 1999, 103, 2347—2354.
91. Huang, Q. R.; Dubin, P. L.; Moorefield, C. N.; Newkome, G. R. Counterion Binding on Charged Spheres: Effect of pH and Ionic Strength on the Mobility of Carboxyl-Terminated Dendrimers. *J. Phys. Chem. B* 2000, 104, 898—904.
92. Milhem, O. M.; Myles, C.; McKeown, N. B.; Attwood, D.; D'Emanuele, A. Solubility Enhancement of a Hydrophobic Drug Using Polyamidoamine Starburst Dendrimers. *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.* 1999, 26, 931—932.
93. Wiwattanapatapee, R.; Jee, R. D.; Duncan, R. PAM-AM Dendrimers as a Potential Oral Drug Delivery System: Dendrimer Complexes with Piroxicam. *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.* 1999, 26, 145—146.
94. Twyman, L. J.; Beezer, A. E.; Esfand, R.; Hardy, M. J.; Mitchell, J. C. The Synthesis of Water Soluble Dendrimers, and Their Application as Possible Drug Delivery Systems. *Tetrahedron Lett.* 1999, 40, 1743—1746.
95. Milhem, O. M.; Myles, C.; McKeown, N. B.; Attwood, D.; D'Emanuele, A. Polyamidoamine Starburst Dendrimers as Solubility Enhancers. *Int. J. Pharm.* 2000, 197, 239—241.
96. Milhem, O. M.; Mobedi, H.; Day, N.; McKeown, N. B.; Attwood, D.; D'Emanuele, A. Development and Characterization of Dendrimer Conjugates Derivatives for Drug Delivery. *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.* 2001, 28, 329—330.
97. Milhem, O. M.; Mobedi, H.; Day, N.; McKeown, N. B.; Attwood, D.; D'Emanuele, A. Development of Dendrimer Conjugates for Drug Delivery. *Polym. Mater. Sci. Eng.* 2001, 84, 721.
98. Sakthivel, T.; Toth, I.; Florence, A. T. Distribution of a Lipidic 2.5nm Diameter Dendrimer Carrier After Oral Administration. *Int. J. Pharm.* 1999, 183, 51—55.
99. Wiwattanapatapee, R.; Carreno-Gomez, B.; Malik, N.; Duncan, R. Anionic PAMAM Dendrimers Rapidly Cross Adult Rat Intestine In Vitro: A Potential Oral Delivery System? *Pharm. Res.* 2000, 17, 991—998.

100. Katchalsky, A. Polyelectrolytes and Their Biological Interactions. *Biophys. J.* 1964, 4, 9–41.
101. Florence, A. T.; Sakthivel, T.; Toth, I. Oral Uptake and Translocation of a Polylysine Dendrimer with a Lipid Surface. *J. Control. Release* 2000, 65, 253–259.
102. Tajarobi, F.; El-Sayed, M.; Rege, B. D.; Polli, J. E.; Ghandehari, H. Transport of Polyamidoamine Dendrimers Across Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Int. J. Pharm.* 2001, 215, 263–267.
103. Zhang, Z. Y.; Smith, B. D. High-Generation Polycationic Dendrimers Are Unusually Effective at Disrupting Anionic Vesicles: Membrane Bending Model. *Bioconjug. Chem.* 2000, 11, 805–814.
104. El-Sayed, M.; Kiani, M. F.; Naimark, M. D.; Hikal, A. H.; Ghandehari, H. Extravasation of Poly (Amidoamine) (PAMAM) Dendrimers Across Microvascular Network Endothelium. *Pharm. Res.* 2001, 18, 23–28.
105. Yoo, H.; Juliano, R. L. Enhanced Delivery of Antisense Oligonucleotides with Fluorophore-Conjugated PAMAM Dendrimers. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, 4225–4231.
106. Haensler, J.; Szoka, F. C., Jr. Polyamidoamine Cascade Polymers Mediate Efficient Transfection of Cells in Culture. *Bioconjug. Chem.* 1993, 4, 372–379.
107. Kukowska-Latallo, J. F.; Bielinska, A. U.; Johnson, J.; Spindler, R.; Tomalia, D. A.; Baker, J. R., Jr. Efficient Transfer of Genetic Material into Mammalian Cells Using Starburst Polyamidoamine Dendrimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 4897–4902.
108. Turunen, M. P.; Hiltunen, M. O.; Ruponen, M.; Virkamäki, L.; Szoka, F. C., Jr.; Urtti, A.; Ylä-Herttuala, S. Efficient Adventitial Gene Delivery to Rabbit Carotid Artery with Cationic Polymer-Plasmid Complexes. *Gene Ther.* 1999, 6, 6–11.
109. Kukowska-Latallo, J. F.; Raczka, E.; Quintana, A.; Chen, C.; Rymaszewski, M.; Baker, J. R., Jr. Intravascular and Endobronchial DNA Delivery to Murine Lung Tissue Using a Novel, Nonviral Vector. *Hum. Gene Ther.* 2000, 11, 1385–1395.
110. Eichman, J. D.; Bielinska, A. U.; Kukowska-Latallo, J. F.; Baker, J. R., Jr. The Use of PAMAM Dendrimers in the Efficient Transfer of Genetic Material into Cells. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2000, 3, 232–245.
111. Bielinska, A. U.; Yen, A.; Wu, H. L.; Zahos, K. M.; Sun, R.; Weiner, N. D.; Baker, J. R., Jr.; Roessler, B. J. Application of Membrane-Based Dendrimer/DNA Complexes for Solid Phase Transfection In Vitro and In Vivo. *Biomaterials* 2000, 21, 877–887.
112. Cheng, H.; Zhou, R.; Liu, L.; Du, B.; Zhuo, R. Cyclic Core Dendrimer as a New Kind of Vector for Gene Transfer into Mammalian Cells. *Genetica (The Hague)* 2000, 108, 53–56.
113. Shah, D. S.; Sakthivel, T.; Toth, I.; Florence, A. T.; Wilderspin, A. F. DNA Transfection and Transfected Cell Viability Using Amphipathic Asymmetric Dendrimers. *Int. J. Pharm.* 2000, 208, 41–48.
114. De Jong, G.; Telenius, A.; Vanderbyl, S.; Meitz, A.; Drayer, J. Efficient In-Vitro Transfer of a 60-Mb Mammalian Artificial Chromosome into Murine and Hamster Cells Using Cationic Lipids and Dendrimers. *Chromosome Res.* 2001, 9, 475–485.
115. Luo, D.; Haverstick, K.; Belcheva, N.; Han, E.; Saltzman, W. M. Poly (Ethylene Glycol) -Conjugated PAMAM Dendrimer for Biocompatible, High-Efficiency DNA Delivery. *Macromolecules* 2002, 35, 3456–3462.
116. Gebhart, C. L.; Kabanov, A. V. Evaluation of Polyplexes as Gene Transfer Agents. *J. Control. Release* 2001, 73, 401–416.
117. Hughes, J. A.; Aronsohn, A. I.; Avrutskaya, A. V.; Juliano, R. L. Evaluation of Adjuvants That Enhance the Effectiveness of Antisense Oligodeoxynucleotides. *Pharm. Res.* 1996, 13, 404–410.
118. Bielinska, A.; Kukowska-Latallo, J. F.; Johnson, J.; Tomalia, D. A.; Baker, J. R., Jr. Regulation of In Vitro Gene Expression Using Antisense Oligonucleotides or Antisense Expression Plasmids Transfected Using Starburst PAMAM Dendrimers. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24, 2176–2182.
119. DeLong, R.; Stephenson, K.; Loftus, T.; Fisher, M.; Alahari, S.; Nolting, A.; Juliano, R. L. Characterization of Complexes of Oligonucleotides with Polyamidoamine Starburst Dendrimers and Effects on Intracellular Delivery. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86, 762–764.
120. Yoo, H.; Sazani, P.; Juliano, R. L. PAMAM Dendrimers as Delivery Agents for Antisense Oligonucleotides. *Pharm. Res.* 1999, 16, 1799–1804.
121. Maeda, H. The Tumor Blood Vessel as an Ideal Target for Macromolecular Anticancer Agents. *J. Control. Release* 1992, 19, 315–324.
122. Malik, N.; Evagorou, E. G.; Duncan, R. Dendrimer-Platinate: A Novel Approach to Cancer Chemotherapy. *Anti-Cancer Drugs* 1999, 10, 767–776.
123. Kono, K.; Liu, M.; Fréchet, J. M. J. Design of Dendritic Macromolecules Containing Folate or Methotrexate Residues. *Bioconjug. Chem.* 1999, 10, 1115–1121.
124. Wiener, E. C.; Konda, S.; Shadron, A.; Brechbiel, M.; Gansow, O. Targeting Dendrimer-Chelates to Tumors and

- Tumor Cells Expressing the High-Affinity Folate Receptor. *Investig. Radiol.* 1997, 32, 748—754.
125. Barth, R. F.; Adams, D. M.; Soloway, A. H.; Alam, F.; Darby, M. V. Boronated Starburst Dendrimer-Monoclonal Antibody Immunoconjugates; Evaluation as a Potential Delivery System for Neutron Capture Therapy. *Bioconjug. Chem.* 1994, 5, 58—66.
126. Yang, W.; Barth, R. F.; Adams, D. M.; Soloway, A. H. Intratumoral Delivery of Boronated Epidermal Growth Factor for Neutron Capture Therapy of Brain Tumors. *Cancer Res.* 1997, 57, 4333—4339.
127. Abu-Rmaileh, R.; Ashford, M.; Day, N.; McKeown, N. B.; Attwood, D.; Stratford, I. J.; D'Emanuele, A. Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers as a Platform for Delivery to Tumour Cells Bearing the Carcinoembryonic Antigen (CEA). *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.* 2002, 29, in press.
128. Kobayashi, H.; Sato, N.; Saga, T.; Nakamoto, Y.; Ishimori, T.; Toyama, S.; Togashi, K.; Konishi, J.; Brechbiel, M. W. Monoclonal Antibody-Dendrimer Conjugates Enable Radiolabeling of Antibody with Markedly High Specific Activity with Minimal Loss of Immunoreactivity. *Eur. J. Nucl. Med.* 2000, 27, 1334—1339.
129. Roberts, J. C.; Adams, Y. E.; Tomalia, D.; Mercer-Smith, J. A.; Lavallee, D. K. Using Starburst Dendrimers as Linker Molecules to Radiolabel Antibodies. *Bioconjug. Chem.* 1990, 1, 305—308.
130. Singh, P.; Moll, F., III. Lin, S. H.; Ferzli, C.; Yu, K. S.; Koski, R. K.; Saul, R. G.; Cronin, P. Starburst Dendrimers: Enhanced Performance and Flexibility for Immunoassays. *Clin. Chem.* 1994, 40, 1845—1849.
131. Baker, J. R., Jr.; Quintana, A.; Piehler, L.; Banazak-Holl, M.; Tomalia, D.; Raczka, E. The Synthesis and Testing of Anti-cancer Therapeutic Nanodevices. *Biomimed. Microdevices* 2001, 3, 61—69.
132. Carnahan, M. A.; Grinstaff, M. W. Synthesis and Characterization of Poly (Glycerol-succinic acid) Dendrimers. *Macromolecules* 2001, 34, 7648—7655.
133. Roberts, J. C.; Bhalgat, M. K.; Zera, R. T. Preliminary Biological Evaluation of Polyamidoamine (PAMAM) Starburst Dendrimers. *J. Biomed. Mater. Res.* 1996, 30, 53—65.
134. Malik, N.; Wiwattanapatapee, R.; Klopsch, R.; Lorenz, K.; Frey, H.; Weener, J. W.; Meijer, E. W.; Paulus, W.; Duncan, R. Dendrimers: Relationship Between Structure and Biocompatibility In Vitro, and Preliminary Studies on the Biodistribution of ^{125}I -Labeled Polyamidoamine Dendrimers In Vivo. *J. Control. Release* 2000, 65, 133—148.
135. Malik, N.; Wiwattanapatapee, R.; Klopsch, R.; Lorenz, K.; Frey, H.; Weener, J. W.; Meijer, E. W.; Paulus, W.; Duncan, R. Erratum to “Dendrimers: Relationship Between Structure and Biocompatibility In Vitro, and Preliminary Studies on the Biodistribution of ^{125}I -Labelled Polyamidoamine Dendrimers In Vivo” [*Journal of Controlled Release* 65 (2000) 133—148]. *J. Control. Release* 2000, 68, 299—302.
136. Brazeau, G. A.; Attia, S.; Poxon, S.; Hughes, J. A. In Vitro Myotoxicity of Selected Cationic Macromolecules Used in Non-viral Gene Delivery. *Pharm. Res.* 1998, 15, 680—684.
137. Kobayashi, H.; Kawamoto, S.; Saga, T.; Sato, N.; Hiraga, A.; Ishimori, T.; Konishi, J.; Togashi, K.; Brechbiel, M. W. Positive Effects of Polyethylene Glycol Conjugation to Generation-4 Polyamidoamine Dendrimers as Macromolecular MR Contrast Agents. *Magn. Reson. Med.* 2001, 46, 781—788.

(李明 滕洋 译)

水凝胶

María Dolores Blanco

Rosa Olmo

José María Teijón

Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

引言

水凝胶是一种具有三维空间网状结构的亲水性聚合物，能在水或生物液体中膨胀，膨胀状态能容纳大量液体^[1]。膨胀平衡状态时的吸水量反映了水凝胶的不同性质，如渗透性、机械性能、表面特性及生物相容性等。由于水凝胶的物理性质与生物组织相似，所以经常作为生物材料使用。这些相似性基于其含水量、柔软度、弹性强度以及在水和生物液体中的低界面张力^[2]。

水凝胶可由各种各样的材料制备而成，如从植物和动物体中提取的天然材料制备，或者由上述这些天然材料的结构修饰物制备，还可以由合成聚合物材料制备。一些天然聚合物，蛋白质（如胶原）^[3]、多糖（如壳聚糖）^[4]或透明质酸^[5]都可使用。而合成聚合物，由于各有特性因而结构多样，在材料的实际应用中经历了巨大的发展^[6]。

水凝胶在脱水状态具有结晶状外观，叫做干凝胶。水凝胶除了字面上的意义（即含水的凝胶）外，还是聚合物或共聚物，具有许多特性。如具有亲水性但在水中不溶；能在水或其他任何水性液体中膨胀；随着体积的增大变得柔软并富有弹性，但仍能保持自身形态，直至达到物理-化学平衡。水凝胶的这些特性由多种因素造成：

- 水凝胶的亲水性是由于聚合链中存在极性基团，如一OH、—COOH、—CONH₂、—HSO₃；
- 水凝胶水中不溶是由于结构中存在有三维交联的网状结构，这种交联是由分子间较弱的内聚力（如范德华力和氢桥）和共价键或离子键形成的；
- 水凝胶的弹性由使用的亲水性单体及聚合物的低密度交联所决定；
- 水凝胶形态的保持是水分渗透入聚合物所产生的渗透力与聚合链所产生的能抵制凝胶膨胀的内聚力两者互相平衡的结果^[7]。

水凝胶的合成

水凝胶以合成单体为基础，通过缩聚或自由基聚合而成。其中缩聚反应需要聚合物单体具有反应官能团^[8]，且反应在成对的官能团之间发生，并有小分子物

质的释放，如 H₂O、NH₃ 或 HCl。一个例子就是聚乙二醇（PEG）的合成。该聚合物能溶于水，在生物医学方面用途广泛^[9]，如作为创伤的敷料及给药系统的基质。聚合物的相对分子质量在两万以下，更高相对分子质量的聚合物叫做聚氧乙烯（PEO）。聚乙二醇水凝胶由相对分子质量较高的 PEO 辐射交联而成^[10]，或者由 PEG 末端的羟基化学交联反应而成。聚乙烯醇的水凝胶可以通过 γ 辐射进行制备^[11,12]。

聚合物合成的另一种形式就是自由基聚合^[13]。这种类型的聚合物是通过具有不饱和和双键的单体分子参与链生成时的活化中心反应聚合而成的大分子。大部分大分子为乙烯聚合物。水凝胶合成时所使用的聚合物单体的化学结构如图 1 所示。

在加成聚合物的形成过程中，链反应要经历三个不同的阶段：①链反应的启动；②链反应的增长；③链反应的终结。聚合反应的开始需要一个单体被激活，不论是由自由基还是由离子引发热反应、光化学反应未激活，这样就可以使被激活的单体在链反应的增长过程中结合在一起。通过这种方式，根据所使用单体的化学性质，聚合物链的线性链或支链就形成了。

聚合反应的链启动过程可以通过 γ 射线诱发产生。在 PEO^[12] 水凝胶及乙烯基单体水凝胶^[14] 的合成时正是使用了这种方法。在后者乙烯基单体水凝胶的合成例子中，使用了一些偶氮化合物，如异丁腈（AIBN）^[15]、2, 2'-偶氮双(2-脞-丙烷)二盐酸化物或 V-50^[16]，以及水溶性盐溶液（如过氧化二硫酸铵）^[17]。通过自由基聚合制备水凝胶所使用的单体大多数是 2-羟乙基甲基丙烯酸酯（HEMA）^[18] 和 N-乙烯基-2-吡咯（烷）酮（VP）^[19]。

很多时候水凝胶不止由一种单体构成，大多数是由两种不同类型的单体形成的共聚物^[8]。共聚物的化学结构由混合物中不同单体的浓度及参与聚合反应官能团的反应能力共同决定。通常共聚反应可以改变水凝胶的机械性能和膨胀能力。因此，由 HEMA 和 VP 共聚得到的水凝胶在膨胀平衡时的吸水量，比聚（2-羟乙基甲基丙烯酸酯）（PHEMA）水凝胶更高，而且前者随共聚物中 VP 比例的增加^[20]其机械特性降低。但是，由 HEMA 和甲基丙烯酸甲酯（MMA）（一种比 VP 亲水性更低的单体）共聚得到的共聚物在膨胀平衡时，比 PHEMA 水凝胶^[21] 的吸水量更少。

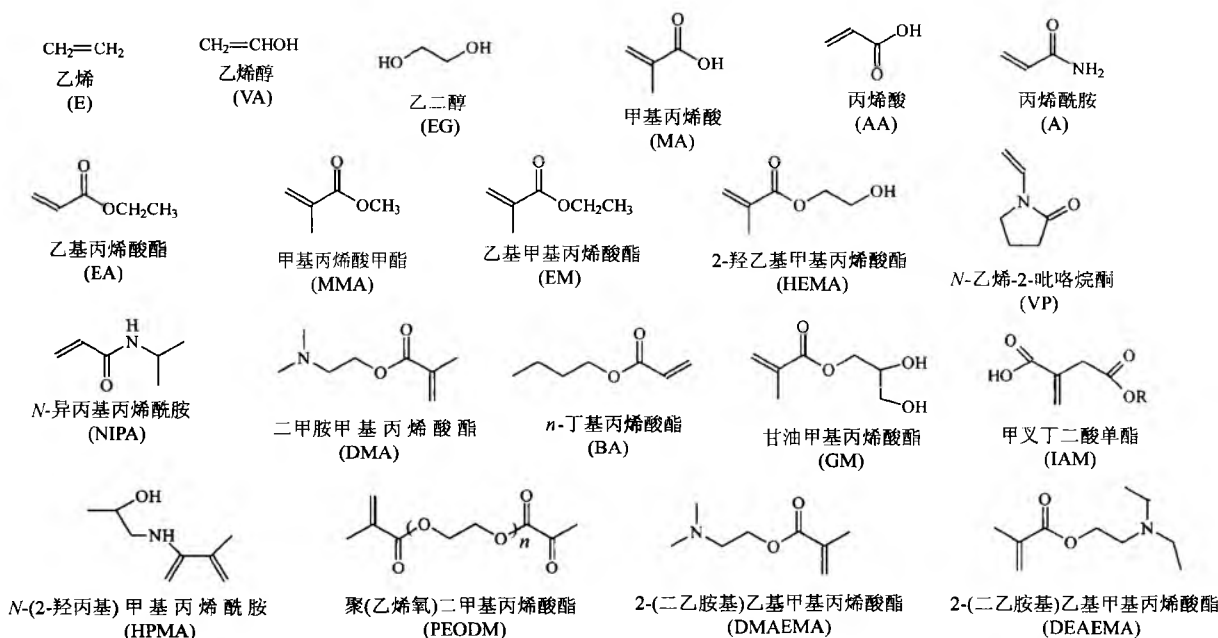


图 1 水凝胶合成时所使用的聚合物单体的化学结构

大量水凝胶合成时使用的交联剂，能够使线性聚合物链互相连接，形成一种具有强化学键合的三维网状结构^[18,19]。聚合物结构中具有某些特定基团，这点很有必要，因为它们可以作为定位点来帮助形成凝胶的网状结构。交联剂的选择取决于反应所用的单体，其结构中必须至少具有两个反应基团，以便可以交联不同的聚合物链。通常使用的交联剂是具有四功能团和六功能团的化合物，如乙二醇二甲基丙烯酸酯（EGDMA）^[22]和 1,1,1-三甲基醇丙基三甲基丙烯酸酯（TPT）^[23]。其他的交联剂也有使用，如乙二胺四乙酸酐（EDTAD）^[24]和季戊四醇三丙烯酸酯（PETA）^[25]（图 2）。根据交联度和制备方法的不同，交联的聚合物表现出差别迥异的性质。通常交联度决定了聚合物的膨胀度、孔径大小、总表面积和机械阻力。

弹性体的大形变能力是由于其中的聚合物链具有柔顺的特性。这种分子微观的柔顺性形成了肉眼可见的大形变能力。如果这些构成弹性体的聚合物链通过共价键互相连接，就形成了固态的三维分子网状结构。当形变力持续存在时，聚合物基质的形变只是暂时的，且形态的恢复是可逆的。聚合物之间的键合和交联能防止链之间的滑动从而维持物体的形态。物体的弹性取决于形成三维网状结构时所引入的交联键的比例（图 3）。

交联密度是材料每单位体积中所存在的交联点的数目。如果交联密度较低，聚合物的网状结构就会展开，使连接交联的聚合物链片段伸长，同时链的柔顺性几乎不受限制，所以使物体表现出弹性行为。如果交联密度较高，网状结构则会紧紧交织在一起。在这种情形下，交联之间的链片段缩短，聚合链被许多接点定位，所以物体失去弹性，变得更加坚固和坚硬。

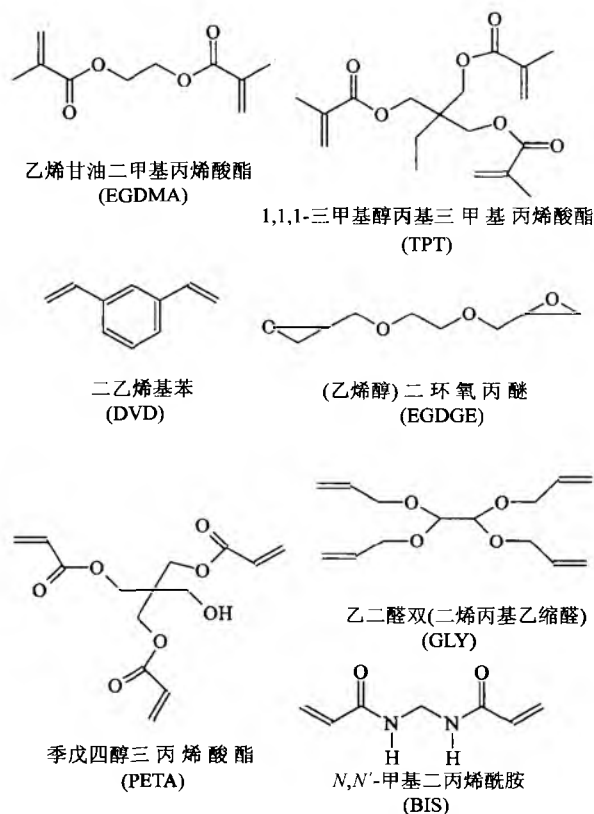


图 2 水凝胶合成时所使用的交联剂的化学结构

然而，现在有无键合的交联聚合物制备 VP 水凝胶的相关报道。制备时 VP 与交联剂环状苯基乙二醇反丁二酸共聚，它是一种二十九元环化合物，有一个聚合双键，聚合物链沿着交联剂的大环排列，这样就形成了交联^[26]。

POLYMERIC NETWORK-CROSS-LINKING DENSITY

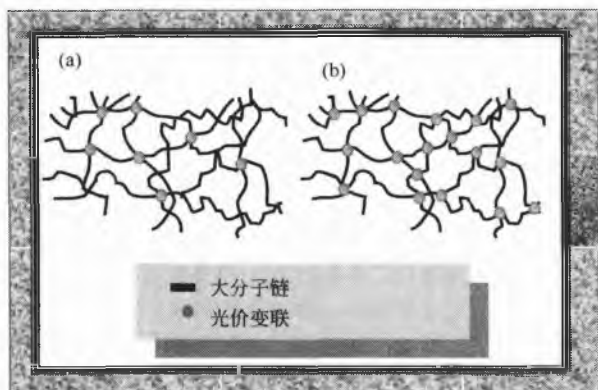


图3 聚合物网状结构的交联密度。(a)低交联密度;(b)高交联密度

单体类型或单体的组成类型都是聚合反应的基本条件,不论合成水凝胶发生的是怎样的聚合反应,水凝胶制备时都有三种聚合过程:本体聚合、悬浮聚合和乳液聚合。本体聚合的体系由单体组成,如果要合成交联凝胶也可以加入交联剂,反应的引发剂置于一个容器中,在这里聚合反应得以进行。这种方法可以使人们根据合成时所使用的不同形状的模具得到形态各异的水凝胶,其中最常见的是圆筒状^[15,16]和薄膜状水凝胶^[27]。对这种聚合过程进行一些

调整也可以让人们得到大孔状水凝胶^[28]。通过孔隙率技术可以计算水凝胶共聚物膜的大孔隙度。利用这种方法,单体共聚可以形成晶体骨架,且在聚合反应后既可以分散在结构中,也可以从共聚物膜中析出。利用冷冻-熔融技术制备大孔膜时需要加入化学惰性物质,这样能够形成一种晶体结构,并且在晶体结构周围单体能够进行聚合。对于亲水性单体,可以使用亲水性体系,在这样的体系中,冰晶可以生长成为晶体骨架。Tighe 教授的实验室利用这些方法,已经成功制备了聚(HEMA)或聚(丙烯酸)的大孔膜^[28]。其他研究人员使用自由基热引发的溶液聚合^[29]方法制备了具有多孔网状结构的 HEMA 聚合物。

在悬浮聚合的方式中,含有引发剂的单体液滴分散在浓缩的盐水溶液中,生成了水凝胶液珠。Lee^[30]教授利用这种方法合成了 PHEMA 的水凝胶。此外,水凝胶也可以通过乳液聚合制备^[1,8],交联聚合物或共聚物通过这种方法可以得到球状水凝胶^[31]。

水凝胶的性质

水凝胶的性质与其结构直接相关。因为聚合物的组成和合成方法必然会影响到聚合物骨架的结构,从而影响到凝胶最后所具有的性质,因此两者都不能单独分开来考虑(图4)。所以当我们提到水凝胶的性质时,必须要参考影响其性质的结构参数。

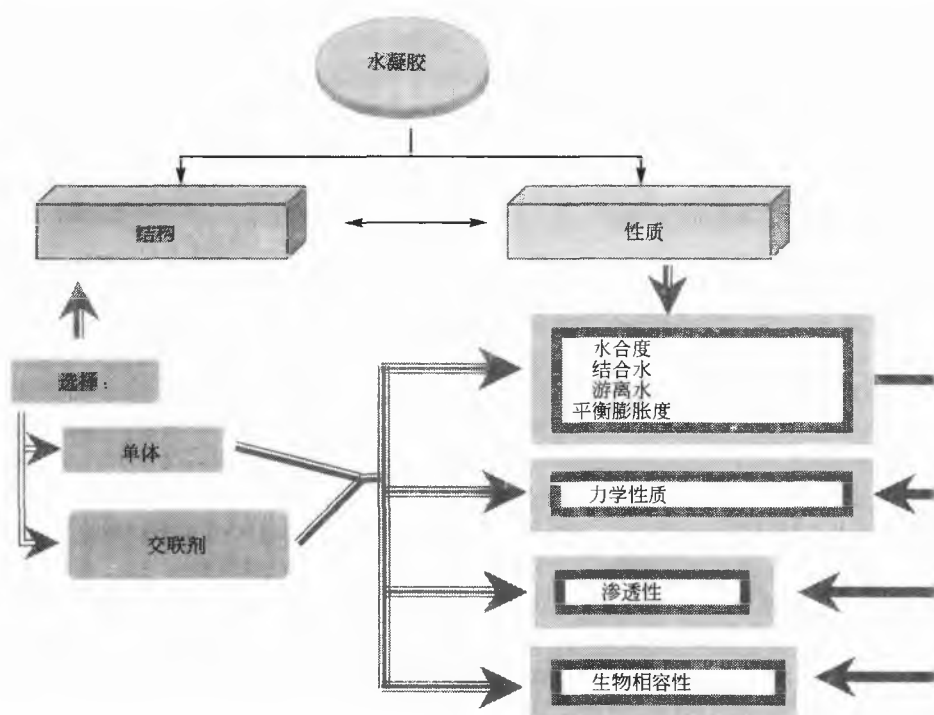


图4 水凝胶结构与性质之间的关系。单体和交联剂的选择决定了水凝胶的性质。

另外,特殊性质的水凝胶必须使用特殊的单体和交联剂来合成

S

1. 膨胀特性

水凝胶的第一个特性就是能吸收水或水溶液。水凝胶膨胀平衡时的吸水量基本由单体性质、交联类型和密度决定,其他的一些因素如温度、离子强度及水合介质的 pH 都会影响水凝胶的吸水量。

水凝胶中水性介质的含量通常通过质量法测定,可以有几种方式表示。水合百分数 (W)^[14] 由以下公式得到:

$$W = (w_1 - w_0) / w_1$$

式中: w_1 和 w_0 分别为膨胀水凝胶和干水凝胶的质量。

膨胀率 (r)^[16] 由以下公式表示:

$$r = (w_1 - w_0) / w_0$$

在特定温度下,水凝胶达到膨胀平衡时其聚合物的体积分数 (Φ_2) 由以下公式得到:

$$\Phi_2 = (D_0 / D)^3$$

式中: D_0 和 D 分别为干凝胶和膨胀凝胶圆片的直径,可以通过千分尺或照相机测定^[32]。

由亲水性单体形成的水凝胶水分含量更多,例如,由 HEMA 和 VP 共聚得到的水凝胶在膨胀平衡时,其水分含量随凝胶中 VP 含量的增加而增加。如果聚合物混合体中 VP 含量为 25wt%,所形成水的凝胶水合百分数为 38.3wt%;如果聚合物混合体中 VP 含量为 50wt%,所形成的水凝胶水合百分数则为 59.3wt%。两种水凝胶均添加 5wt% EGDMA 交联^[33]。

另一个影响水凝胶吸水量的因素是交联度。交联剂含量增大,水凝胶的膨胀百分数则减小。因此,对于 PHEMA 水凝胶,当交联剂 (EGDMA) 含量从 0.5wt% 增加到 5wt% 时^[22],膨胀百分数也从 36wt% 变化到 29wt%。许多水凝胶都有相同的情形,如由交联剂 EGDMA 交联形成的 HEMA 和丙烯酰胺 (A) 的共聚物^[34]、由交联剂 N , N' -亚甲基双丙烯酰胺 (BIS) 或 glyoxal bis (diallyl acetal) (GLY)^[35] 交联形成的 N -异丙基丙烯酰胺 (NIPA) 和丙烯酸 (AA) 的共聚物。

同样,交联剂的类型也会影响水凝胶膨胀平衡时的吸水量。比如,由 TPT 交联 (1wt%) 的 PHEMA 水凝胶膨胀百分率为 $W=23\text{wt}\% \sim 27\text{wt}\%$,比由 EGDMA 交联并在同样条件下合成的水凝胶膨胀百分率更低^[23]。同样地, NIPA 和 AA 的共聚物如果以 GLY 作为交联剂,其膨胀程度就比使用 BIS 交联剂更大^[35]。

有些水凝胶的膨胀与温度和介质的 pH 有关。聚 (N -异丙基丙烯酰胺) 和它的共聚物在温敏水凝胶的发展中获得了广泛的研究。交联的 PNIPA 体积相变温度 (VPTT) 在水性介质中大约为 32℃。当温度低于 VPTT,交联的 PNIPA 基质则超量吸水膨胀形成水凝胶。当温度上升超过 VPTT,水凝胶则会迅速收缩。水凝胶的这种对温度敏感的特性是由于聚合链的组成中存在亲水-疏水的平衡,这种平衡直接导致了线性 PNIPA 在水溶液^[36] 中所表现出的低临界溶液温度 (LCST) 现象。而且,现在已经合成了各种各样由 PNIPA 共聚的水凝胶,它们对温度都很敏感^[37,38]。

此外,人们由含水的聚 (L-联氨酸异丙酰胺) 制备了水凝胶微囊^[39]。这种微囊在 33~35℃ 之间形态的大小会产生变化,33℃ 以下是球形,而高于 35℃ 则聚集在一起。这种感温型的形态变化是可逆的。Yoshida 和 Carenza 等制备了另一种类型的温度敏感型水凝胶,这种水凝胶由 TPT 交联^[40,41],并由聚 (丙烯酸-L-脯氨酸甲酯) 合成,在 4℃ 时膨胀率为 63%~74% (膨胀水凝胶体积/干水凝胶体积,%) ,而在 37℃ 使则会收缩。

pH 敏感型水凝胶是由于骨架结构中存在弱酸性或 (和) 一些基本官能团。外部介质的 pH 及离子强度决定了功能团的电离作用,从而使凝胶具有吸水特性。Falamazian 的实验室已经合成了各种疏水性/聚电解质的共聚物水凝胶。他们的研究报道显示,由二乙烯基苯 (DVB) 交联的聚 (甲基丙烯酸甲酯/二甲基胺乙基甲基丙烯酸) (MMA/DMA) 水凝胶是聚阳离子的 pH 敏感型水凝胶,在酸性 pH 中能大量水合,在碱性和中性 pH 时则呈玻璃状^[42,43]。现在人们已经开发了化学合成的聚丙烯酰胺-瓜尔胶交联微凝胶,具有弱阴离子基团^[31]。由于结构中存在可电离的羧基,这种微凝胶对 pH 及外部介质的离子强度都很敏感。在较高 pH 值,如高于阴离子微凝胶的 pK_a 值 ($pK_a=4.6$) 时,其溶剂扩散率有显著增高。当 $pH > pK_a$ 时,羧基解离,从而使微凝胶中的渗透压增加,导致凝胶膨胀增大。静电斥力会引起交联的网状结构膨胀,因而使水分子渗透入凝胶的骨架中。另一种 pH 敏感型水凝胶是由 EGDMA 交联,并由 N -丙烯酰胺- N' -甲基哌嗪和 MMA 共聚形成^[44]。哌嗪单元的叔胺基团具有质子化作用,能够产生静电斥力,导致水凝胶的膨胀增加,所以当在较低 pH ($pH=2.6$) 时,水凝胶也会膨胀。在 $pH=7$ 的溶液中,水凝胶的膨胀降低。同样,由壳聚糖交联,由聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和戊二醛混合形成的聚合物网状结构也具有 pH 敏感性特征^[45]。相对于中性或碱性介质,酸性环境 ($pH=1 \sim 2$) 对这种水凝胶的膨胀性能有一定影响。由于壳聚糖中伯氨基的质子化作用,在酸性条件下,水凝胶的膨胀增加。

2. 水凝胶的机械性能

水凝胶的机械性能可以用橡胶弹性和黏弹性理论来描述^[46],橡胶弹性是链方向和链结构的时间独立性回归,而黏弹性则是链方向和链结构的时间依赖性回归。水凝胶橡胶弹性的机械性质可以通过拉力测定,而黏弹性则可以通过动态机械分析仪来测定。

Huglin 等通过压-拉测量仪测定了各种水凝胶的机械性能^[32,35,47,48]。杨氏弹性模量 (E) 由压力 (τ)-拉力 ($\lambda-1$) 作图的斜率求得。 τ 即水凝胶每单位面积上所施加的压力, λ 是水凝胶变形长度与未变形长度的比值。在拉力覆盖的范围内,压力 (τ)-拉力 ($\lambda-1$) 图呈线性。

压缩模量 (G) 由 τ 对 $(\lambda-\lambda^{-2})$ 的曲线斜率求得,在低拉力下, $\tau=G(\lambda-\lambda^{-2})$ 。如果压缩模量已知,有效交联密度 (ν_e) 可以从以下方程式中得到:

$$G = RT\nu_e\Phi_2^{1/3}$$

式中: T 为温度, K。

有效交联密度是一个试验数量, 不像理论交联密度 (ν_l), 它可以由下面的式子求得:

$$\nu_l = Cf/2;$$

式中: C 为所加入的交联剂浓度, mol/dm³; f 为交联剂的官能团数。

根据 ν_e 值, 交联之间的摩尔质量 (M_c) 可从下面公式中计算出:

$$M_c = \rho/\nu_e$$

式中: ρ 为水凝胶的密度; 可由质量和体积求得。交联之间的摩尔质量也可以通过 Peppas-Merril 关系式得到^[49]。

同样, 根据 ν_e 值, 聚合物和水之间的相互作用参数 (χ) 可以下面公式计算:

$$\ln(1 - \Phi_2) + \Phi_2 + \chi \Phi_2^2 + \nu_e V_1 (\Phi_2^{1/3} - 2\Phi_2 f^{-1}) = 0$$

式中: V_1 为水分子在特定温度下的摩尔体积, dm³/mol。

水凝胶的机械性能主要取决于水凝胶的组成和结构。许多时候, 水凝胶比较脆弱, 所以不能负重, 如多数材料不能作为受伤组织的替代物。尽管水凝胶聚合物骨架中所吸收的水分含量对于水凝胶的扩散性、渗透性及生物相容性等性质至关重要, 但许多时候也会在水凝胶的机械性能产生负面影响。而且, 水凝胶中状态水也会影响水凝胶的机械性质。因为水作为一种增塑剂, 能够使水凝胶体系的玻璃转化温度降低^[21], 因此凝胶中凝固水比例增加, 会使凝胶的机械阻力变弱, 从而影响到凝胶的机械特性。提高水凝胶机械性能的方法主要是与疏水性单体进行交联或共聚。

一些高亲水性水凝胶, 如以 EGDMA (0.5wt% ~ 5wt%) 作为交联剂, 由 PVP 形成的水凝胶^[47], 聚合物和水之间的相互作用参数值 χ (0.49 ~ 0.57) 较小, 杨氏模量 (0.019 ~ 0.504 MPa) 则随交联剂比例的增大而有所升高。VP 和疏水性单体, 如 n -丙烯酸丁酯 (BA)^[48] 共聚得到的水凝胶, 其机械性能有显著提高, 压缩模量 (G) 随凝胶中 BA 含量的增多而增大。比如, 水凝胶中 BA 为 2wt% 时, G 为 0.046 MPa; BA 为 60wt% 时, G 为 0.0256 MPa。它们均以 1wt% 的 TPT 作为交联剂, 其弹性力却有所下降

($E=0.0829 \sim 0.148$ MPa)。所以, 在这样的水凝胶中, 交联剂增加, 弹力下降, 压缩模量系数会增加 (比如含 60wt%BA 的水凝胶, 交联剂 TPT 为 2.5wt% 时, $G=0.439$ MPa), 同时有效交联密度更大 (比如含 60wt%BA 水凝胶, 交联剂 TPT 分别为 1wt% 和 2.5wt% 时, ν_e 分别为 0.115mol/dm³ 和 0.195mol/dm³), 结果交联之间的摩尔质量则更小 (比如含 60wt%BA 水凝胶, 其中 TPT 分别为 1wt% 和 2.5wt%, M_c 分别为 9700g/mol 和 5700g/mol)。

交联剂类型同样也会在水凝胶的机械性能产生重要影响, 如 NIPA 和 AA^[35] 的共聚物水凝胶以 BIS 为交联, 则其机械性能比乙二醛双 (联丙烯乙缩醛) (GLY) 为交联的水凝胶更好。所以, 对于含有 10mol%AA 的水凝胶, 当由 2.5mol%BIS 交联时, 可压系数为 6.68kPa; 而由同样比例的 GLY 交联的水凝胶, 可压系数则为 1.44kPa。只不过由 GLY 交联的水凝胶膨胀率要大得多。

由此可知, 水凝胶的机械阻力是可变的。有些弱机械性能的水凝胶, 如由 CaCO₃ 交联的离子化海藻酸水凝胶, 结构中具有 D-葡萄糖- δ -内酯, 其可压系数达到 175kPa^[50]。然而, 其他一些水凝胶具有明显的机械阻力, 比如由 PVP/ β 壳聚糖形成, 具有戊二醛^[51] 结构的水凝胶; 或者由聚 (3-羟丁基酯) 和网状 PEG^[52] 构成的半渗透水凝胶, 它们各自的拉伸强度在干燥状态分别为 43.13 MPa 和 350.6 MPa。聚乙烯醇水凝胶叫做 SalubriaTM^[53], 可压系数在 1 ~ 18 MPa 之间, 这个数值也在关节软骨的可压系数范围内。不同水凝胶的网状结构参数值如表 1 所示。

水凝胶在生物学上的应用

如前所述, 由于性质可以通过其组成和制备方法加以调节, 水凝胶在生物医学领域中具有广泛的应用。通过上述方法, 可以提高水凝胶基质的膨胀水平。此外, 水凝胶所具有的生物稳定性或生物降解特性, 以及机械特征能用于特定领域。由于这些性质复杂多样, 因此水凝胶的应用也多种多样, 其中的某些应用将在以下的章节中进行介绍。

表 1 一些水凝胶的网状结构参数

水凝胶	Φ_2	ν_l /(mol/L)	ν_e /(mol/L)	E /kPa	G /kPa	M_c /(g/mol)	χ	文献
PVP-EGDMA 0.5%	0.039	62×10^{-3}	5.7×10^{-3}	19		216 000	0.491	[47]
PVP-EGDMA 5%	0.227	616×10^{-3}	114×10^{-3}	504		10 700	0.572	[48]
VP/BA (98/2)-TPT 1%	0.100	94.3×10^{-3}	40.4×10^{-3}	148	46	30 200	0.507	
VP/BA (40/60)-TPT 1%	0.758	86.2×10^{-3}	114.8×10^{-3}	82.9	256	9 700	1.148	
VP/BA (40/60)-TPT 2.5%	0.782	215.6×10^{-3}	194.8×10^{-3}	1 399	439	5 700	1.208	[35]
NIPA/AA (90/10)-BIS 2.5%	0.15	0.508	18.4×10^{-3}	22	6.68	60.4	0.57	
NIPA/AA (90/10)-GLY 2.5%	0.18	1.05	5.71×10^{-3}	4.54	1.44	204	0.57	[50]
LH 海藻酸 (4.5%, w/v)-CaCO ₃ (1.5%)					175			
PVA (75%水分)					1 000 ~ 18 000			[53]

续表

水凝胶	Φ_2	ν_1 /(mol/L)	ν_e /(mol/L)	E /kPa	G /kPa	M_c /(g/mol)	χ	文献
PEO (1.5g/dL)-0.47kGy/h						12 000		[12]
PEO (1.5g/dL)-6.1kGy/h						10 200		
PEO (2g/dL)-0.47kGy/h						9 800		
PEO (2g/dL)-6.1kGy/h						6 100		
PVA-EDTAD 5%			5.5×10^{-3}	3				[27]
PVA-EDTAD 25%			202×10^{-3}	199				
PEGDA : PETA (10 : 0)						62.4		[25]
PEGDA : PETA (10 : 2)						39.8		

注：VP 表示 *N*-乙烯基-2-吡咯（烷）酮；PVP 表示聚 VP；EGDMA 表示乙二醇二甲基丙烯酸酯；BA 表示丁基丙烯酸；TPT 表示 1, 1, 1-三甲基丙烷三甲基丙烯酸酯；NIPA 表示 *N*-1 异丙基丙烯酰胺；AA 表示丙烯酸；BIS: *N*, *N'*-亚甲基双丙烯酰胺；PVA 表示聚乙烯醇；EDTAD 表示乙二胺四乙酸酐；PEGDA 表示聚乙二醇二丙烯酸酯；PETA 表示季戊四醇三丙烯酸酯；PEO 表示聚氧化乙烯。 Φ_2 表示聚合物体积分数； ν_1 表示理论交联密度； ν_e 表示有效交联密度； E 表示杨氏系数， G 表示可压系数； M_c 表示交联之间的摩尔质量； χ 表示聚合物-水的相互作用参数。

1. 接触（隐形）眼镜和眼部埋植剂

接触性软镜即隐形眼镜，是水凝胶最广泛的一种应用。这种眼镜主要的特性就是人们佩戴后感觉相当舒适，因为它们能准确调节到与眼球的曲率一致，而且使空气中的氧溶解在眼镜的水液中并通过扩散到达角膜，直至接近与假想的蒸馏水眼镜一样的渗透极限。Baker 等^[21]的研究显示，水凝胶的平衡水量和对氧气的渗透力之间有关。如 HEMA-VP 的共聚物水凝胶平衡水量为 80%，对氧有很高的渗透力，比起 HEMA-VP-苯乙烯的共聚物水凝胶还稍高，后者的平衡水量大约为 70%。

20 世纪 70 年代，Wichterle 研究了以乙二醇甲基丙烯酸酯为基质的水凝胶^[54]，并自行研制了第一个隐形眼镜。

而第一个真正成功上市的隐形眼镜则是由 PHEMA 制备的水凝胶，其含水量为 38%。有些制药公司相继研制了含有不同单体的水凝胶眼镜，如 VP、甲基丙烯酸（MAA）、甘油甲基丙烯酸酯（GM）。同时试制了其他材质的水凝胶接触镜^[55,56]，能够提高水分含量并改善机械性能，以便能更好地抵制眼睑的眨动，同时提高对氧的渗透性（表 2）。考虑水凝胶眼镜可能会引起眼部充血时，氧的渗透性是一个至关重要的因素，因为这种眼镜可能会产生局部缺氧的问题^[57]。氧的渗透传输值应该比 125×10^{-9} Dk/L 更大，这样可以防止闭眼时眼间质的缺氧^[58]。一些高氧渗透性的水凝胶材料可以满足这个要求，比如，硅油水凝胶镜的透氧值为 140Dk（Lotrafilon A-CIBA Vision）^[57]。

表 2 选用的接触软镜材料

商品名	主要成分	水分含量/%	透氧性/Dk	屈光率指数	生产厂商
Optima FW	Polymacon(HEMA)	38.6	8.4×10^{-11}	1.43	Bausch & Lomb
Soflens66	Alphafilcon A(HEMA/VP/TBCM)	66	32×10^{-11}	1.39	Bausch
Soflens	Hilafilcon A(HEMA/VP)	70	33×10^{-11}	1.38	Bausch
Purevision	Balafilcon A(SVC/VP/VA)	36	99×10^{-11}	1.426	Bausch
Focus	Nelfilcon A(PVA/NFMA)	69	26×10^{-11}	1.38	Ciba Vision
Cibasoft	Tefilcon A(HEMA)	37.5	8.9×10^{-11}	1.43	Ciba
Focus Monthly Visitint	Vifilcon A(HEMA/EDMA/MAA)	55	16.0×10^{-11}	1.415	Ciba
Focus Night and Day	Lotrafilcon A(氟-硅酮水凝胶)	24	140×10^{-11}	—	Ciba
Acuvue	Etafilcon A(HEMA/MAA)	58	28×10^{-11}	1.40	Vistakon
Horizon 55EW	Methafilcon A(HEMA)	55	18.8×10^{-11}	1.41	Westcon Contact Lens
Proclear	Omafilcon (HEMA/MCOE-PC)	59	—	—	Biocompatibles International

注：HEMA 表示 2-羟乙基甲基丙烯酸酯；VP 表示 *N*-乙烯基-2-吡咯烷酮；TBCM 表示 4-*t*-丁基-2-羟环己基异丁烯酸；SVC 表示乙烯基甲基丙烯酸硅酮；VA 表示乙烯基丙烯酸；NFMA 表示 *N*-甲酰甲基丙烯酰胺；EDMA 表示乙烯二甲基丙烯酸酯；MAA 表示甲基丙烯酸；MCOE-PC 表示 2-甲基丙烯酸酐氧乙基磷脂酰胆碱；PVA 表示聚乙烯醇。

晶状体的取代品——透明的人工晶状体(IOL)已经成为白内障手术中的一个不可分割的部分。由于人工晶状体的埋植需要通过眼部的一个小切口,所以人们研制了可折叠的水凝胶眼镜,如 PHEMA 水凝胶(屈光率为 1.44,含水量为 38%)、HEMA 和 MMA 的共聚物水凝胶(屈光率为 1.47,含水量为 20%)、6-羟基乙基异丁烯酸水凝胶(屈光率为 1.47,含水量为 18%)^[59]。这些亲水性的材料对角膜内皮的损伤更小,且产生炎症反应的概率也更低。

眼睛的玻璃体是一种亲水性凝胶,由胶原和玻璃质酸的网状结构形成,含水量在 99% 以上,但是在某些病变状态时会丧失自身功能。正因为如此,尽管并没有得到真正令人满意的研究成果^[60],人们还是研制了一些可以替代眼睛玻璃体的水凝胶,如 PVP 水凝胶、聚丙烯酰胺(PA)水凝胶及 PVA 水凝胶等。

2. 人造组织及再生组织

在水凝胶作为人体组织替代材料的应用中,比较可行的一种就是替代人体软骨。当数以百万计的患者在遭受退行性关节炎疾病的痛苦之时,水凝胶这种用途的重要性是显而易见的。它能有效治愈疾病,帮助在受伤及发病期间的受损软骨得到修复。这些切实可行的治疗方法就是使用一种与天然软骨相似的材料,通过关节镜检查后替代原有软骨。这种天然软骨具有蛋白聚糖基质,并且结构中存在氨基葡萄糖,所带负电荷能够容纳水分子。如果施以压力,这些水分子会从凝胶基质中排出,这样可以帮助缓冲外力。基于此因,软骨的生物功能实际上可以看作是一种特殊的具有物理化学活性的生物水凝胶^[61]。水凝胶可以作为模型系统,研究其内在膨胀系数对于凝固行为的影响,并得到基本参数的相关信息,以便更好地控制人造软骨的机械性能。

考虑到上述的水凝胶,可以理解人们正在热衷于寻找一种水凝胶性质的材料以取代聚乙烯(PE),能够部分或全部作为人造软骨的代用品。因此,京都大学的学者们研究了具有机械性能和良好润滑性能的 PVA 水凝胶。在压力下,这种水凝胶具有比 PE 更厚的液膜,且磨损因子是 PE 的 5 倍。体内试验显示,埋植人体内直到 52 周,组织周围未见有降解^[62],而且相对于超高相对分子质量的聚乙烯(UHMWPE),生物相容性似乎有所提高^[63,64]。其他研究者最近通过制备一种机械性能与软骨相类似^[65]的半透膜水凝胶,研制了一种可以替代人体软骨组织的材料。PHEMA 水凝胶的机械摩擦性能和磨损性能已经得到研究,它有可能作为人造软骨的代用品^[66]。然而,大部分具有应用前景的水凝胶却是由冷冻-熔融技术^[67]制备的一些 PVA 水凝胶,其中之一叫做 SalubriaTM^[53]。这种水凝胶的含水量和机械性能与人造软骨相当接近。

其他的研究者正试图模拟天然的胶原纤维,致力于开发含有聚乙烯对苯二甲酸酯的螺旋纤维的水凝胶,以便可以得到一种机械性能与韧带近似的材料,能够用来替代结缔组织^[68]。

水凝胶也可以作为人造乳房,因为它具有膨胀性能,看上去和活体组织相似。对那些移植过人造乳房的妇女进行医疗随访,结果表明,这些移植体在 18~48 个月后仍能保持柔软^[69]。然而,所有的已知结果并不一致,因为这种由 PVP 水凝胶填充且表面有纹理的人造乳房,当移植入患者体内,由于有组织液渗透^[70],体积明显增大。

水凝胶用于中枢神经系统(CNS)的再生同样引起了人们的极大兴趣。通过离心力已经合成了化学交联的 PHEMA 细管,其外径为 2.4mm,壁厚 40~400 μ m,能够在神经系统中诱导再生^[71]。另外,Woerly 的实验室研究了大分子网状结构的水凝胶,可以作为细胞间质在治疗过程中诱导组织生长和形成,这样就能促进受损的中枢神经系统进行组织的重组和轴突的再生。他们还通过聚合物-细胞结构杂合的手段,研究水凝胶替代中枢神经系统组织的可能性。在这样的杂合结构中,细胞置于一个稳定的三维空间聚合物基质中,并有足够的死体积容纳细胞生物体的蓄积,也有足够的表面积以满足细胞的生长^[72]。因此,他们研制了由 BIS 交联并含有胶原的 N-(2-羟丙基)甲基丙烯酸酯(HPMA)水凝胶。在这种水凝胶中,胚胎神经元、初生星形胶质细胞和神经鞘细胞能被固定,在聚合物的基质中,这些细胞却经常变化与分化。向大鼠大脑新皮质中植入水凝胶,最初的研究结果显示,大鼠非神经元细胞迁移到了凝胶中^[73],这表明聚合物确实与大鼠的神经系统发生了相互作用。在这种类型的水凝胶中存在氨基糖和多肽序列,除了能自身血管化以及被宿主非神经元细胞(如星形胶质细胞和巨噬细胞)浸润外,还能够提高与神经组织的黏附性;同时人们还检测到结构中存在大量的轴突^[74]。这种含有神经组织细胞的水凝胶能够用来修复和再生中枢神经系统。

3. 组织工程学

组织工程学的目的就是开发可供组织和器官移植选择的部分机体。研究中脚手架材料很关键,通过它可以引导细胞粘连、新组织的生长和形成。近来,人们开发水凝胶作为支架材料应用于组织工程中。

能够用来制备组织工程中使用的凝胶的材料之一是多糖。通常,通过氢键和离子相互作用可以形成多糖基质的水凝胶。其中,首选琼脂糖和壳聚糖水凝胶,其次为海藻酸和角叉菜胶^[75]。壳聚糖-乙酸溶液在一个适当的模具中通过冷冻干燥可以制备壳聚糖水凝胶,它具有多孔结构,能够用于细胞移植和组织再生^[76]。由于孔洞的大小和方向可以控制,所以壳聚糖支架的机械性能也能控制。壳聚糖基质水凝胶的应用之一就是用在软骨组织工程中^[75]。还开发了由碳酸钙、硫酸钙、D-葡萄糖- δ -内酯酶离子交联的海藻酸水凝胶。这种水凝胶能生成机械性能相同的基质,能与细胞特别是格根包尔氏细胞相结合,并且细胞的培养是在三维空间中进行的^[50]。

另一种类型的水凝胶是由 2-羟基-1-[4-(羟乙氧基)苯]-2-甲基-1-丙酮作为紫外光引发剂,用聚氧乙烯二甲基

丙烯酸 (PEODM) 通过光聚作用得到。聚合物包装成软骨细胞, 作为支架可以帮助软骨生长^[77]。

为了提高细胞的黏附性或者促进细胞的生物特异性黏附, 人们将合成的生物材料用作为细胞黏附的配体的多肽进行修饰^[78]。根据这种方法, 合成了聚乙二醇二丙烯酸酯和丙烯酸聚乙二醇-RGDS 的水凝胶。RGDS 是一种多肽, 含有与 PEG 聚集的 TGF- β_1 (生长因子 β_1 的变异性)。TGF- β , 能促进血管平滑肌细胞外间质蛋白的合成。如果大鼠胸动脉中植入了 PEG 基质的水凝胶, 平滑肌肉细胞的生长比缺 TGF- β 的水凝胶更快。因此, 这种组合物能够明显改善水凝胶的机械性能^[79]。

利用水凝胶制备的支架还有其他方面的用途, 如作为牙浆组织代用品^[80]或者固定重造的下颌骨踝^[81]。

4. 生物传感器

水凝胶可用来制备生物传感器, 作为酶固化的支持剂。Veronese 实验室已经制备了各种固化酶生物传感器, 其中之一是利用 PEG-修饰的葡萄糖氧化酶固化在 PVA 低温凝胶膜上, 通过冷冻-熔融循环过程制备了一种电流型传感器。这种传感器通过测定酶反应时过氧化氢的生成, 来测定葡萄糖的电化学性质, 因此它可以用来测定血清中葡萄糖的电化学情况^[82]。同样, 考虑到临床上也可以利用这种传感器测定乙酰胆碱, 人们通过将乙酰胆碱酯酶和胆碱氧化酶 (像 PEG-修饰的胆碱氧化酶) 固化在 PVA 低温凝胶膜上, 研制了一种特殊的传感器。

乙酰胆碱被乙酰胆碱酯酶水解后, 产生胆碱, 而胆碱氧化酶又能作用于胆碱产生过氧化氢^[83], 所以这种传感器可以测定乙酰胆碱水解后的过氧化氢的生成。PEG 化是增加酶体积的关键步骤, 酶体积的增加能提高其在凝胶中的保留程度, 还能增大基质中酶的溶解度。脂酶的固化也是如此。制备 PVA 水凝胶时先将酶与 PEG 聚集, 这样设计的水凝胶能用于生物催化^[84]。

要测定的是过氧化氢本身, 所以人们通过聚乙二醇二环氧甘油醚 (PEGDGE) 交联, 将各种还原酶引入到聚 (乙烯咪唑) 与 Os(4, 4'-二甲双胍)₂Cl 混合的水凝胶中, 制备了水凝胶改良的石墨电极, 并作为生物传感器, 用来测定过氧化氢。制备的所有生物传感器中大多是 H₂O₂ 敏感性传感器, 并且最灵敏的 H₂O₂ 传感器中含有最新纯化的红薯过氧化酶^[85]。

在临床和法医检验以及食品和饮料生产中, 要测定的化合物是酒精。用聚磺化氨甲酰 (PCS) 水凝胶来固化醇氧化酶, 制备了一种生物传感器, 可以作为电流放大器来测定乙醇^[86]。

5. 创伤敷料

水凝胶由于能在伤口部位生成永久保湿介质, 刺激疤痕愈合过程中的细胞活性, 因此可以用来帮助溃疡面和创面的组织再生。而且, 水凝胶还能吸收组织渗出液和分泌物。水凝胶形成了潮湿的环境, 有助于软化和分离坏死组织, 可以帮助组织在肉芽形成阶段再生, 同时吸收分泌物, 为上皮组织细胞的分化与细胞活化创造一个适宜的环境。而且, 这种敷料不会粘连伤口, 对患者是非常有利的。同样, 它们与一些抗生素结合能够抑制细菌滋生, 并且促进氧气渗透。为了给创伤部位创造舒适的条件, 水凝胶敷料应该具有一个较好的水蒸气渗透速率^[87]。动物实验研究证实, 水凝胶敷料能够显著加快伤口的愈合速度^[88]。

一些实验室已经开发并上市了水凝胶类型的创伤敷料 (表 3), 它们都具有含水量高的特性, 有时候含水量高出质量的 95%。它们的组成多种多样, 包括聚氨酯、聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺/琼脂、氨基和腈基取代丙烯酸酯衍生的交联聚合物、壳聚糖衍生物和 PVP 以及透明质酸与 (或) 海藻酸的衍生物。

表 3 选用的创伤敷料

商品名	主要成分	生产商
Tenderwet	聚丙烯酸酯	Hartmann
Hidrosorb	聚氨酯	Hartmann
Geliprem	聚丙烯酰胺/琼脂	Inibsa
Hyflex	Hypan® (由几个亲水基团序列和腈基基团序列构成的丙烯酸酯衍生物)	Hymedix
Aquatrix II	壳聚糖衍生物/聚乙烯亚胺/PVP	Hydromer
Clear Hydrogel Films	多糖基质的水凝胶	Veraco International
Hyalofill	Hyaff (透明质酸基质的水凝胶)	Convatec, S. A.
Jaloskin	Hyaff	Convatec, S. A.
Hyalogran	Hyaff	Convatec, S. A.
Hyalgin	Hyaff	Convatec, S. A.

正在研究用明胶海绵制备的含有表皮生长因子(EGF)的敷料,当其被置于弹性聚氨酯膜上时,可以帮助细胞分化和上皮细胞的再生。大鼠体内试验结果表明,这些敷料能够使伤口面积得到更大程度的修复^[89]。有人制备了含有抗菌化合物的创伤敷料。这种敷料由于具有羧甲基-甲壳质水凝胶层,所以能够吸收伤口的渗出液。而敷料的抗菌能力则是由渗透入壳聚糖醋酸泡沫中^[90]的葡萄糖酸洗必泰所产生。其他创伤敷料是由 PVP 与 PEG 和琼脂^[91]混合形成的交联水凝胶,以及聚乙烯醇和 PVP 的混合水凝胶^[92];也有人制备了 PEO 和 PEO/PVA 混合的水凝胶伤口敷料^[93];还有人通过在柔软的 PHEMA 基质中嵌入织物纤维^[94],在聚 2-羟乙甲基丙烯酸酯基础上制备了人造皮肤,可以作为先进的创伤敷料使用。

6. 给药系统

制剂产品的药效很大程度上取决于药物剂型,也即药物的生物利用度。近来人们普遍接受的一个观点认为,一个化合物自身的药理作用并不足以保证能有一个确切的治疗,而一个最理想的疗效则取决于适当的剂型、处方类型以及特定的释药系统的选择。

在特定使用时,药物疗效需要化合物在一长段时间内维持适当的浓度水平(通常指血浆浓度水平)。然而,多数时候,传统的给药方式很难控制血浆中药物的浓度,因为当服用一定剂量的药物后,会引起生物活性产物的浓度发生变化。传统的给药系统会导致无效或毒性的时段交替出现。这些问题导致了新型给药技术的发展,其直接目的就是要使机体(甚至靶器官)中单剂量的药物浓度在适当的时段里得到维持^[95],并远离无效或毒性的极限。

给药系统能使药物在治疗期间的一个延续时间或特定时间里释放。而且,通过这些系统,药物能在机体的靶组织中释放,并能降低副作用,防止生物屏障对药物的影响^[96]。在可行的给药系统中,水凝胶作为给药装置得到了广泛的研究^[96,97]。因为水凝胶具有许多优良的特性,如吸水性、膨胀性及渗透性等,并且能随物理、化学和生物刺激进行结构转化^[97,98],所以它们也被称为“智能型”或应激型给药系统。

6.1 水凝胶的通透性

含有活性药物的水凝胶适合用于机体可接触部位用药,如口腔、鼻腔、阴道以及口服或透皮给药,也可以植入皮下,或者通过外科手术^[97]放入到生物活性物质的靶环境中。

向水凝胶中引入药物或活性物质有两种方法:第一种是物理方法。将干凝胶加入到药物浓溶液中,当达到膨胀平衡时凝胶脱水^[14,15],即以凝胶膨胀平衡为分界。如果药物在所需的合成条件下能保持稳定,为了直接得到载药的水凝胶^[17],可以将药物加入到聚合的反应混合体系中。第二种方法是化学方法。这种方法是通过形成酯、酐或酰胺键(酰胺键随后会在水性介质中水解),将药物固定在水凝

胶基质中,并能使药物从基质中释放^[99]。

分散在水凝胶中的药物释放时,如果开始是脱水状态(干凝胶),是由药物从聚合物骨架中扩散;如果开始是玻璃态,则是水或生物液体反方向扩散^[100]。当载药水凝胶与亲水性介质接触时,水分子便渗透入骨架中,凝胶开始膨胀,聚合物的玻璃化转变温度降低并形成橡胶态。这种状态能增加聚合物对药物的通透性,使其能向外扩散^[101]。

为了对水凝胶的膨胀动力学和凝胶中药物的释放进行解释,人们使用了水分吸收入玻璃状水凝胶通常表现出从 Fickian 到 Case II 扩散的反常行为概念,因为凝胶膨胀与药物释放都由膨胀界面上聚合物的玻璃-橡胶转化的舒张速度决定的。以下方程式可以用来描述聚合物不同类型的短时间的溶质扩散^[101]:

$$M_t/M_\infty = kt^n$$

式中: M_t 和 M_∞ 分别为吸水试验中,时间 t 和无穷时间所吸收的水分量,在药物释放试验中, M_t 和 M_∞ 分别为在时间 t 和无穷时间药物的释放量; k 为一个结合凝胶结构和装置几何特征的常数; n 为决定释放机制的扩散指数。平板几何形状的装置, $n=0.5$ 代表了 Fickian 扩散机制;如果 $n=1$, 药物释放为非时间依赖性,符合零级释放动力学,叫做 Case II 输送,在这种情况下,药物释放受膨胀控制;当 n 值介于 0.5~1 之间则为不规则输送,表明药物释放同时受到扩散和膨胀的控制。在球形或圆柱形的聚合物装置中, $n=0.43$ (球形) 或 $n=0.45$ (圆柱形) 表明药物输送是 Fickian 扩散机制;而 $n=0.85$ (球形) 或 $n=0.89$ (圆柱形) 则表明是 Case II 输送; n 取中间值表明是不规则的药物输送^[102]。

聚合物凝胶中药物输送受 Fickian 扩散还是松弛时间的控制,另一种判断标准就是测定 Deborah 扩散值 (De),它是聚合物在膨胀压力下特征弛张时间 (λ) 和特征扩散时间 (θ) 之间的比值,可以由样品厚度 (h) 的平方系数和聚合物凝胶中水的扩散系数 (D) 进行定义^[103]:

$$De = \lambda/\theta = \lambda(h^2/D)$$

如果膨胀过程受弛张时间的控制 ($De \gg 1$) 或受水扩散的控制 ($De \ll 1$), 扩散机制为 Fickian 扩散。但是,如果 $De \approx 1$, 两种过程都会同时发生,且药物输送呈不规则型。

另一个表征聚合物扩散性质的参数是膨胀界面数 (Sw), 是描述溶剂渗透和药物释放平衡的无量纲数^[103]:

$$Sw = v\delta/D$$

式中: v 为凝胶玻璃/橡胶前沿移动的速度; δ 为膨胀凝胶层的厚度; D 为药物在聚合物中的扩散系数。当 $Sw \gg 1$ 时,因为释放机制为 Fickian 扩散,药物膨胀比释放更快;当 $Sw \ll 1$ 时,表明呈零级释放,药物从溶解区域的输送速度比玻璃-橡胶前沿移动速度更快;当 $Sw \approx 1$ 时,不规则释放行为占优势。

当系统具有 Fickian 扩散特征时,认为平板的非常薄凝胶相药物释放是一元扩散,扩散系数常数为 D ^[104], Fick 定律微分形式的解为

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} \exp\left[-\frac{D(2n+1)^2 \pi^2 t}{h^2}\right]$$

式中： h 为干凝胶的厚度； t 为时间。

这个方程式通过简化可以得到早期和中期的扩散时间：

$$\frac{M_t}{M_\infty} \approx 4(Dt/\pi h^2)^{\frac{1}{2}}, \quad \frac{M_t}{M_\infty} \leq 0.6$$

一个 Fickian 扩散的标准认为 M_t/M_∞ 对 $t_{1/2}$ 的曲线应呈线性，直到减少 60% 的水分吸收。

扩散系数能从接近后期时间中计算：

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - [(8/\pi^2) \exp(-\pi^2 Dt/h^2)], \quad \frac{M_t}{M_\infty} \geq 0.4$$

这个方程式更适合于测定高相对分子质量药物的扩散系数^[105]。

从聚(2-羟乙基甲基丙烯酸-co-丙烯酰胺) [p (HEMA-co-A)] 水凝胶^[34]、聚(2-羟乙基甲基丙烯酸-co-甲基丙烯酸甲酯) [p (HEMA-co-MMA)]^[105] 水凝胶，以及其他水凝胶中测定的扩散指数 n 接近 0.5。通常来讲，共聚物水凝胶中亲水单体增加，扩散系数也会增加，表明膨胀更快。比如，5wt% EGDMA 交联，含 80wt% HEMA 和 20wt% A 的水凝胶，在盐溶液 (0.9wt% NaCl) 中的扩散

系数为 $9.27 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ($9.27 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$)，而以同样比例交联，含 60wt% HEMA 和 40wt% A 的水凝胶，其扩散系数则为 $15.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ($15.0 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$)^[34]。共聚物凝胶 p (HEMA-co-MMA) 的疏水性单体 (MMA) 增加，凝胶吸水的扩散系数会降低。如 75mol% HEMA 水凝胶的扩散系数为 $3.03 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ，而 60mol% HEMA 水凝胶^[105] 的扩散系数则为 $1.78 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。

水凝胶中药物的释放由聚合物基质的理化性质及药物的自身性质决定。通常，共聚物中亲水性单体增加有助于药物的释放^[34]。交联增加使基质的孔径缩小，会减慢药物的释放，导致药物的扩散系数值更小^[33]。药物的化学性质同样会影响扩散系数。比如，阿糖胞苷从聚(丙烯酸-co-单/甲基亚甲基丁二酸) [p (A-co-MMI)] 水凝胶 (特别是从 75A/25MMI 组成的水凝胶) 中的释放时，其扩散系数为 $8.25 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ^[106]，而 5-氟尿嘧啶从同样的水凝胶中的释放系数^[107] 则是 $13.3 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 。Peppas 实验室^[105] 针对不同水凝胶中药物大小对扩散系数的影响进行了全面的研究。不同水凝胶中释放的药物如表 4 所示。

表 4 不同水凝胶中释放的药物

水凝胶	药物	文献
聚(2-羟乙基甲基丙烯酸)	硫酸	[30]
	L-抗坏血酸	[15]
	阿糖胞苷	[17, 18]
	5-氟尿嘧啶	[22, 23]
聚(2-羟乙基甲基丙烯酸-co-丙烯酰胺)	5-氟尿嘧啶	[126]
聚(2-羟乙基甲基丙烯酸-co-甲基丙烯酸甲酯)	阿糖胞苷	[34]
	茶碱、氨苯蝶啶、氧烯洛尔、丁咯地尔、维生素 B ₁₂ 、菊粉、肌红蛋白	[105]
聚(2-羟乙基甲基丙烯酸-co-N-乙基-2-吡咯(烷)酮)	阿糖胞苷	[33, 127]
聚(2-羟乙基甲基丙烯酸-co-N, N'-二甲基-N-甲基丙烯酰氧乙基-N-(3-磺丙基)铵)	水杨酸钠	[14]
聚(甲基丙烯酸甲酯-co-甲基丙烯酸二甲胺乙酯)	氨基比林、咖啡因、可可碱	[110]
聚(丙烯酸乙酯-甲基丙烯酸甲酯)(Eudragit)	酒石酸美多洛尔	[117]
聚(丙烯酸-co-丙烯酰胺)	甲氨蝶呤	[128]
聚(丙烯酰胺-co-单甲基亚甲基丁二酸)	5-氟尿嘧啶	[107]
	阿糖胞苷	[106]
聚(丙烯酸-co-n-烷基丙烯酸甲酯)	茶碱、氨茶碱	[16]
修饰的聚丙烯酰胺-g-瓜尔胶	地尔硫草、硝苯地平	[31]
聚(丙烯酸 L-脯氨酸-甲酯)	庆大霉素、异烟肼、胰岛素	[41]
聚(甲基丙烯酸菊粉-co-双(甲基丙烯酰氨基)偶氮苯-co-2-羟乙基甲基丙烯酸)	氢化泼尼松	[124]
聚(环氧乙烷)	水杨酸钠	[12]
聚(乙二醇二丙烯酸酯)	牛血清白蛋白 (BSA)	[25]
壳聚糖	辣椒碱、香草壬酰胺	[129]
壳聚糖/聚[N-乙基-2-吡咯(烷)酮]	羟氨苄青霉素	[45]

6.2 应激性水凝胶装置

由于水凝胶由单体合成, 对不同的环境刺激敏感, 利用这种特性能使水凝胶中的药物或生物活性化合物随环境刺激进行释放。

引起水凝胶敏感的刺激因素之一是温度。这种类型的水凝胶如聚(丙烯酰胺-*L*-脯氨酸-甲酯) [p(A-ProOMe)] 的感温型水凝胶, 人们利用它释放庆大霉素, 治疗传染性疾病; 释放异烟肼, 治疗结核病; 释放胰岛素, 治疗糖尿病^[41]。水凝胶的收缩或膨胀在高相对分子质量的药物释放中有一定作用, 例如胰岛素的释放, 受到水凝胶温度敏感特性的影响。但是这种性质却不能控制低相对分子质量化合物的释放, 如庆大霉素和异烟肼。还有其他化合物能从感温型水凝胶中释放, 如链激酶——一种从聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)和聚(甲基丙烯酸)(PMAA)的嵌段共聚物中得到的抗凝血剂^[108]。同样, 聚(*N*-异丙基丙烯酰胺-*co*-甲基丙烯酸丁酯-*co*-丙烯酸)水凝胶中的激素降钙素, 能随 pH 和温度的变化进行释放^[109]。

一些感温型水凝胶也对 pH 敏感^[108,109]。这种水凝胶的 pH 敏感特性是由于骨架结构中存在有弱酸和(或)弱碱性官能团。许多时候, 人们将这些水凝胶设计为在人体内具有 pH 特征的区域进行药物的释放。如胃部, pH 呈酸性; 或者小肠, 其 pH 为中性或碱性。研究发现, 聚丙烯酰胺-瓜尔胶(pAAM-g-GG)交联的水凝胶中两种抗高血压药物——盐酸地尔硫革和硝苯地平, 在人工胃液和肠液的 pH 条件下能够得到释放^[31], 并且在 pH 为 7.4 的介质中比酸性介质中释放更快。氨基比林、咖啡因和可可碱都呈弱碱性, 在 pH 为 1.2 的介质中具有最大溶解度, 在水中溶解度不同。有人研究了它们在由 DVB 交联的 p(MMA/DMA)水凝胶(一种聚阳离子水凝胶, 在酸性 pH 条件下为含水状态, 在中性 pH 时脱水变得坚硬)中^[110]的扩散特征。在最大膨胀状态能产生弱酸化条件的 pH 敏感性水凝胶是以壳聚糖/PVP 为骨架的半渗透膜凝胶^[45], 有人将它研制成释药装置, 在胃酸条件下阿莫西林抗生素可以得到释放。

人们研制了含有不同的化合物的其他水凝胶, 这些化合物通常为酶类, 能使其对特殊的分子发生反应。如有人合成了聚(溴化甲基苯羟乙胺-*g*-乙烯乙二醇)[p(DEAEM-g-EG)]水凝胶, 其中含有葡萄糖氧化酶, 具有葡萄糖敏感性。也有人将过氧化氢酶固化在这些水凝胶中, 目的是为了减少葡萄糖氧化酶反应时产生的过氧化氢的数量, 同时增加酸生成时氧的数量。水凝胶中这些酶都具有活性, 能创造一个酸性环境, 从而导致聚合物骨架的膨胀^[111]。这种给药系统的目的就是要实现胰岛素的反馈控制释放, 通过这种方式, 水凝胶中胰岛素的释放可以随葡萄糖调控的凝胶膨胀变化而得到控制。

还有人研制的其他应激性给药系统, 如对钙反应的释药系统。例如在含有 α -淀粉酶的淀粉-纤维素骨架中, 钙的存在引起基质的降解, 从而使基质骨架中的药物得到释

放^[112]。有人合成了 PVA 骨架的水凝胶, 由于它们对凝血酶敏感^[113], 所以仅在发生感染时释放抗生素。另一种释放药物或生物活性物质的系统是抗原反应型水凝胶, 它由抗体-线性聚丙烯酰胺和适当的抗原-交联聚丙烯酰胺形成^[114]。

6.3 给药途径

人们所设计的控释水凝胶的目的就是要通过不同的途径进行给药, 如口腔、鼻腔、阴道、皮下给药或透皮吸收^[97]。

水凝胶的口服给药引起了研究者的极大兴趣, 这种给药方式主要通过两种手段实现。

黏膜黏附性水凝胶 策略之一是研制黏膜黏附性水凝胶^[115]。由于聚合物基质表面^[116]具有羟基、羧基、氨基、酰胺基, 所以水凝胶主要通过氢键和分子间引力与黏膜相互作用, 结果形成了物理缠结和次级键合, 这样能延长制剂在吸收部位的滞留时间。

利用口腔放置控释药物装置, 能够避免药物在胃肠道内降解和肝首过代谢。为达到这个目的, 有人制备了丙烯酸树脂口腔片(一种聚乙基丙烯酸甲酯甲基丙烯酸酯和亲水性聚合物的共聚物), 它具有生物黏附性, 能使美多心安(一种治疗高血压药物)得到控释。如果有亲水性聚合物加入, 由于其具有吸水能力^[117], 所以美多心安的释放会发生变化。

人们研究了各种能与黏膜黏附的材料。对志愿者进行鼻腔给药, 研究了壳聚糖微球和淀粉微球的生物黏附性, 并探究其作为生物黏附性鼻腔给药系统的某些特征。研究表明, 壳聚糖微球能降低药物从鼻腔中的清除速率, 并显著增加释药系统与鼻腔的接触时间^[118]。有人将脱乙酰甲壳质和羧甲基甲壳质混合, 制备了聚两性水凝胶, 并对其黏附特性进行了研究。在研究中发现, 凝胶的黏附性受凝胶中水分含量的控制, 较低含水量水凝胶具有更强的黏附性^[119]。

利用猪的胃、舌下、阴道及肠黏液进行体内试验, 研究了由 DVB 交联的聚 *N*, *N*-二甲基氨基乙基甲基丙烯酸-*co*-甲基丙烯酸 [p(DMA/MMA)] 水凝胶的生物黏附特性。这些多基的疏水性凝胶在所有的黏液试验中都表现出很好的黏附性, 所以成为在这些部位进行控释给药的候选基质^[120]。

由于在黏液表面会发生黏液凝胶层的翻转, 在一些组织部位(如小肠), 翻转非常快, 所以研制这种黏膜黏附性释药机制就更加困难。这些释药机制非特异性黏附的事实促使人们对外源凝集素和类外源凝集素分子的释药系统进行了研制。这种释药系统中的药物能与细胞膜直接作用, 产生了与黏液翻转无关的细胞膜黏附^[121]。

pH 敏感性水凝胶 第二种研制水凝胶口服给药的手段, 是利用水凝胶对消化道不同区域 pH 变化的敏感特性^[31,45,110,122,23]。这种方式使水凝胶在胃或小肠这样的酸性或中性 pH 环境中膨胀, 并且释放活性物质。

S

另一种系统与水凝胶口服给药系统相似,能在结肠释放药物。这种体系利用了结肠中所存在的特异性微生物。这些特异性微生物在结肠区域形成了部分微生物群。这些微生物的分泌酶能水解一些多糖,如聚糖酐或胰岛素,也能分解偶氮化合物。一些偶氮菊粉和偶氮葡聚糖凝胶能够分别被结肠里的菊糖酶和葡聚糖酶特异性水解^[124,125]。

水凝胶给药的另一途径就是皮下埋植。在这种给药方式中,水凝胶的含水量是影响生物相容性的一个重要因素,因为含水量越高,水凝胶与机体组织就越相似。皮下埋植的水凝胶周围有或没有一个细小的纤维囊的存在,大部分取决于凝胶膨胀平衡时的吸水量,且吸水量也会影响其形成所需要的时间^[126]。当药物通过水凝胶皮下给药时,它们在血浆中的半衰期显著延长。如由EGDMA交联的p(HEMA-co-A)水凝胶,5-氟尿嘧啶用药后的半衰期($t_{1/2}=25.11\text{h}$)比腹腔内注射($t_{1/2}=0.257\text{h}$)延长了98倍^[126]。将抗癌药阿糖胞苷加入到PHEMA和聚(2-羟乙基甲基丙烯酸-co-N-乙烯基-2-吡咯(烷)酮)[p(HEMA-co-VP)]的水凝胶中,并由EGDMA交联,经皮下给药,也表现出同样的明显现象。尽管阿糖胞苷注射后血浆半衰期为2.6h^[127],但在皮下埋植后的4~16天,在血浆中仍能检测到阿糖胞苷。

药物水凝胶的经皮给药在一些疾病的治疗中具有优势。有人研究了甲氨蝶呤从由丙烯酰胺交联的AA及其共聚物水凝胶中经皮离子导入的情况,并利用这种给药方式治疗银屑病。这些水凝胶适宜甲氨蝶呤的局部给药,这样可以防止口服给药^[128]产生的后继效应(主要是肝脏毒性)。其他经皮给药水凝胶的药物是辣椒碱和香草壬酰胺,它们用来局部治疗风湿性关节炎^[129]。同样,有人设计了壳聚糖基质的经皮给药系统,盐酸普萘洛尔^[130](一种用于治疗心动过速、心颤和心率失常的药物)可以从凝胶中得到释放。

人们可以合成具有各种特性的聚合物水凝胶,能保持生物稳定性也能进行生物降解,其机械性能和膨胀程度与其特殊应用相适应,这使水凝胶成为应用广泛且多样的材料,在生物医学领域具有光明的前景。

参考文献

- Bouwstra, J. A.; Junginger, H. E. Hydrogels. In Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 1st Ed.; Swarbrick, J., Boylan, J. C. Eds; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1993; Vol. 7, 441-465.
- Blanco, M. D.; García, O.; Trigo, R. M.; Teijón, J. M.; Katime, I. 5-Fluorouracil release from copolymeric hydrogels of itaconic acid monoester. I. Acrylamide-co-monomethyl itaconate. Biomaterials 1996, 17 (11), 1061-1067.
- Rao, J. K.; Ramesh, D. V.; Rao, K. P. Implantable controlled delivery systems for proteins based on collagen-pH EMA hydrogels. Biomaterials 1994, 15 (5), 383-389.
- Roberts, G. A. F. Chitin Chemistry; The Macmillan Press Ltd.: London, 1992.
- Luo, Y.; Kirker, K. R.; Prestwich, G. D. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films; New biomaterials for drug delivery. J. Control. Release 2000, 69, 169-184.
- Lowman, A. M.; Peppas, N. A. Hydrogels. In Encyclopedia of Controlled Drug Delivery; Mathowitz, E. Ed.; John Wiley & Sons: New York, 1999; Vol. 2, 397-418.
- Peppas, N. A.; Mikos, A. G. Preparation Methods and Structure of Hydrogels. In Hydrogels in Medicine and Pharmacy; Peppas, N. A. Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1986; Vol. 1, 1-27.
- Katime, I. Química Física Macromolecular; Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco; Bilbao, Spain, 1994.
- Harris, J. M. Introduction to Biotechnical and Biomedical Applications of Poly (ethylene glycol). In Poly (ethylene glycol) Chemistry; Biotechnical and Biomedical Applications; Harris, J. M. Ed.; Plenum Press: New York, 1992; 1-14.
- Stringer, J. L.; Peppas, N. A. Diffusion of small molecular weight drugs in radiation-crosslinked poly (ethylene oxide) hydrogels. J. Control. Release 1996, 42, 195-202.
- Peppas, N. A.; Keys, K. B.; Torres-Lugo, M.; Lowman, A. M. Poly (ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery. J. Control. Release 1999, 62, 81-87.
- Savas, H.; Güven, O. Investigation of active substance release from poly (ethylene oxide) hydrogels. Int. J. Pharm. 2001, 224, 151-158.
- Ebdon, J. R., Ed.; New Methods of Polymer Synthesis; Blackie & Sons Ltd.: Glasgow, 1991.
- Blanco, M. D.; Riego, J. M.; Huglin, M. B. Drug release with simultaneous dimensional changes from a new copolymeric hydrogel. Polymer 1994, 35, 3487-3491.
- Trigo, R. M.; Blanco, M. D.; Huerta, P.; Olmo, R.; Teijón, J. M. L-Ascorbic acid release from PHEMA hydrogels. Polym. Bull 1993, 31, 577-584.
- Katime, I.; Novoa, R.; Zuluaga, F. Swelling kinetics and release studies of theophylline and aminophylline from acrylic acid/*n*-alkyl methacrylate hydrogels. Eur. Polym. J. 2001, 37, 1465-1471.
- Teijón, J. M.; Trigo, R. M.; García, O.; Blanco, M. D. Cytarabine trapping in poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels; Drug delivery studies. Biomaterials 1997, 18, 383-388.
- Trigo, R. M.; Blanco, M. D.; Teijón, J. M.; Sastre, R. Anticancer drug, ara-C, release from pH EMA hydrogels. Biomaterials 1994, 15, 1181-1186.
- Davis, T. P.; Huglin, M. B.; Yip, D. C. F. Properties of poly (*N*-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels crosslinked with ethyleneglycol dimethacrylate. Polymer 1988, 29, 701-706.

20. Davis, T. P.; Huglin, M. B. Studies on copolymeric hydrogels of *N*-vinyl-2-pyrrolidone with 2-hydroxyethyl methacrylate. *Macromolecules* 1989, 22, 2824–2829.
21. Baker, D. A.; Corkhill, P. H.; Ng, C. O.; Skelly, P. J.; Tighe, B. J. Synthetic hydrogels: 2. Copolymers of carboxyl-, lactam- and amide-containing monomers—Structure/property relationships. *Polymer* 1988, 29, 691–700.
22. García, O.; Trigo, R. M.; Blanco, M. D.; Teijón, J. M. Influence of degree of crosslinking on 5-fluorouracil release from poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *Biomaterials* 1994, 15, 689–694.
23. García, O.; Blanco, M. D.; Gómez, C.; Teijón, J. M. Effect of the crosslinking with 1, 1, 1-trimethylolpropane trimethacrylate on 5-fluorouracil release from poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *Polym. Bull.* 1997, 38, 55–62.
24. Ruiz, J.; Mantecón, A.; Cádiz, V. Synthesis and properties of hydrogels from poly (vinyl alcohol) and ethylenediaminetetraacetic dianhydride. *Polymer* 2001, 42, 6347–6354.
25. Mellott, M. B.; Searcy, K.; Pishko, V. Release of protein from highly cross-linked hydrogels of poly (ethylene glycol) diacrylate fabricated by UV polymerization. *Biomaterials* 2001, 22, 929–941.
26. Zilkha, A. Non-bond crosslinked polymer hydrogels. *Eur. Polym. J.* 2001, 37, 2145–2146.
27. Ruiz, J.; Mantecón, A.; Cádiz, V. Synthesis and properties of hydrogels from poly (vinyl alcohol) and ethylenediaminetetraacetic dianhydride. *Polymer* 2001, 42, 6347–6354.
28. Oxley, H. R.; Corkhill, P. H.; Fitton, J. H.; Tighe, B. J. Macroporous hydrogels for biomedical applications: Methodology and morphology. *Biomaterials* 1993, 14, 1064–1072.
29. Dziubla, T. D.; Torjman, M. C.; Joseph, J. L.; Murphy-Tatum, M.; Lowman, A. M. Evaluation of porous networks of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) as interfacial drug delivery devices. *Biomaterials* 2001, 22, 2893–2899.
30. Lee, P. I. Dimensional changes during drug release from a glassy hydrogel matrix. *Polym. Commun.* 1983, 24, 45–47.
31. Soppimath, K. S.; Kulkarni, A. R.; Aminabhavi, T. M. Chemically modified polyacrylamide-g-guar gum-based crosslinked anionic microgels as pH-sensitive drug delivery systems; Preparation and characterization. *J. Control. Release* 2001, 75, 331–345.
32. Huglin, M. B.; Rehad, M. M. A. M.; Zakaria, M. B. Thermo dynamic interactions in copolymeric hydrogels. *Macromolecules* 1986, 19, 2986–2991.
33. Blanco, M. D.; Trigo, R. M.; García, O.; Teijón, J. M. Controlled release of cytarabine from poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-*N*-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1997, 8, 709–719.
34. Sastre, R. L.; Blanco, M. D.; Gómez, C.; Socorro, J. M.; Teijón, J. M. Cytarabine trapping in poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-acrylamide) hydrogels; Drug delivery studies. *Polym. Int.* 1999, 48, 843–850.
35. Xue, W.; Champ, S.; Huglin, M. B. Network and swelling parameters of chemically crosslinked thermoreversible hydrogels. *Polymer* 2001, 42, 3665–3669.
36. Li, S. K.; D'Emanuele, A. On-off transport through a thermoresponsive hydrogel composite membrane. *J. Control. Release* 2001, 75, 55–67.
37. Xue, W.; Champ, S.; Huglin, M. B. Thermoreversible swelling behaviour of hydrogels based on *N*-isopropylacrylamide with a zwitterionic comonomer. *Eur. Polym. J.* 2001, 37, 869–875.
38. Ju, H. K.; Kim, S. Y.; Lee, Y. M. pH/temperature-responsive behaviour of semi-IPN and comb-type graft hydrogels composed of alginate and poly (*N*-isopropylacrylamide). *Polymer* 2001, 42, 6851–6857.
39. Makino, K.; Fujita, Y.; Takao, K.; Kobayashi, S.; Ohshima, H. Preparation and properties of thermosensitive hydrogel microcapsules. *Colloids Surf. B: Biointerf.* 2001, 21, 259–263.
40. Martellini, F.; Higa, O. Z.; Takacs, E.; Safran, A.; Yoshida, M.; Kataskai, R.; Carenza, M. Thermally reversible gels based on acryloyl-L-proline methyl ester. *Radiat. Phys. Chem.* 1999, 55, 185–192.
41. Caliceti, P.; Salmaso, S.; Lante, A.; Yoshida, M.; Katakai, R.; Martellini, F.; Mei, L. H. I.; Carenza, M. Controlled release of biomolecules from temperature-sensitive hydrogels prepared by radiation polymerization. *J. Control. Release* 2001, 75, 173–181.
42. Siegel, R. A.; Falamarzian, M.; Firestone, B. A.; Moxley, B. C. pH-controlled release hydrophobic/polyelectrolyte copolymer hydrogels. *J. Control. Release* 1988, 8, 179–182.
43. Falamarzian, M.; Varshosaz, J. The effect of structural changes on swelling kinetics of polybasic/hydrophobic pH-sensitive hydrogels. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 1998, 24, 667–669.
44. Gan, L. H.; Deen, G. R.; Gan, Y. Y.; Tam, K. C. Water sorption studies of new pH-responsive *N*-acryloyl-*N'*-methyl piperazine and methyl methacrylate hydrogels. *Eur. Polym. J.* 2001, 37, 1473–1478.
45. Risbud, M. V.; Hardikar, A. A.; Bhat, S. V.; Bhonde, R. R. pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyr-

- rolidone hydrogels as controlled release system for anti-biotic delivery. *J. Control. Release* 2000, 68, 23—30.
46. Anseth, K. S.; Bowman, C. N.; Brannon-Peppas, L. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials* 1996, 17, 1647—1657.
47. Davis, T. D.; Huglin, M. B.; Yip, D. C. F. Properties of poly (*N*-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels crosslinked with ethyleneglycol dimethacrylate. *Polymer* 1988, 29, 701—706.
48. Huglin, M. B.; Rehab, M. M. A. M. Mechanical and thermodynamic properties of butyl acrylate-*N*-vinylpyrrolidone hydrogels. *Polymer* 1987, 28, 2200—2206.
49. Peppas, N. A.; Merrill, E. W. Poly (vinyl alcohol) hydrogels: Reinforcement of radiation-crosslinked networks by crystallization. *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* 1976, 14, 441—445.
50. Kuo, C. K.; Ma, P. X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* 2001, 22, 511—521.
51. Risbud, M. V.; Bhat, S. V. Properties of polyvinyl pyrrolidone/ β -chitosan hydrogel membranes and their biocompatibility evaluation by haemorheological method. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2001, 12, 75—79.
52. Hao, J.; Deng, X. Semi-interpenetrating networks of bacterial poly (3-hydroxybutyrate) with net-poly (ethylene glycol). *Polymer* 2001, 42, 4091—4097.
53. Stammen, J. A.; Williams, S.; Ku, D. N.; Guldberg, R. E. Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression. *Biomaterials* 2001, 22, 799—806.
54. Wichterle, O.; Lim, D. Hydrophilic gels for biological use. *Nature* 1960, 185, 117—118.
55. Pedley, D. G.; Skelly, P. J.; Tighe, B. J. Hydrogels in biomedical applications. *Br. Polym. J.* 1980, 12, 99—110.
56. Lloyd, A. W.; Faragher, R. G. A.; Denyer, S. P. Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials* 2001, 22, 769—785.
57. Toit, R.; Simpson, T. L.; Fonn, D.; Chalmers, R. L. Recovery from hyperemia after overnight wear of low and high transmissibility hydrogel lenses. *Curr. Eye Res.* 2001, 22, 68—73.
58. Harvitt, D.; Bonanno, J. Re-evaluation of the oxygen diffusion model for predicting minimum contact lens *Dk/t* values needed to avoid corneal anoxia. *Optom. Vis. Sci.* 1999, 76, 712—719.
59. Kohnen, T. The variety of foldable intraocular lens materials. *J. Cataract Refract. Surg.* 1996, 22, 1255—1257.
60. Chirila, T. V.; Hong, Y.; Dalton, P. D.; Constable, I. J.; Refojo, M. F. The use of hydrophilic polymers as artificial vitreous. *Prog. Polym. Sci.* 1998, 23, 475—508.
61. Broom, N. D.; Oloyede, A. The importance of physico-chemical swelling in cartilage illustrated with a model hydrogel system. *Biomaterials* 1998, 19, 1179—1188.
62. Oka, M.; Noguchi, T.; Kumar, P.; Ikeuchi, K.; Yamamuro, T.; Hyon, S. H.; Ikada, Y. Development of an artificial articular cartilage. *Clin. Mater.* 1990, 6, 361—381.
63. Noguchi, T.; Yamamuro, T.; Oka, M.; Kumar, P.; Koutoura, Y.; Hyon, S.; Ikada, Y. Poly (vinyl alcohol) hydrogel as an artificial articular cartilage: Evaluation of biocompatibility. *J. Appl. Biomater.* 1991, 2, 101—107.
64. Oka, M.; Ushio, K.; Kumar, P.; Ikeuchi, K.; Hyon, S. H.; Nakamura, T.; Fujita, H. Development of artificial articular cartilage. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H. J. Eng. Med.* 2000, 214, 59—68.
65. Corkhill, P. H.; Fitton, J. H.; Tighe, B. J. Towards a synthetic articular cartilage. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1993, 4, 615—630.
66. Freeman, M. E.; Furey, M. J.; Love, B. J.; Hampton, J. M. Friction, wear, and lubrication of hydrogels as synthetic articular cartilage. *Wear* 2000, 241, 129—135.
67. Gu, Z. Q.; Xiao, J. M.; Zhang, X. H. The development of artificial articular cartilage—PVA—hydrogel. *Biomed. Mat. Eng.* 1998, 8, 75—81.
68. Ambrosio, L.; De Santis, R.; Iannace, S.; Netti, P. A.; Nicolais, L. Viscoelastic behaviour of composite ligament prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, 42, 6—12.
69. Ersek, R. A.; Salisbury, A. V. Textured surface, non-silicone gel breast implants: four years' clinical outcome. *Plast. Reconstr. Surg.* 1997, 100, 1729—1739.
70. Benediktsson, K.; Perbeck, L. G. Fluid retention in Bioplasty Misti Gold II breast prostheses with development of capsular contracture. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* 2000, 34, 65—70.
71. Dalton, P. D.; Shoichet, M. S. Creating porous tubes by centrifugal forces for soft tissue application. *Biomaterials* 2001, 22, 2661—2669.
72. Woerly, S.; Plant, G. W.; Harvey, A. R. Neural tissue engineering: From polymer to biohybrid organs. *Biomaterials* 1996, 17, 301—310.
73. Woerly, S.; Plant, G. W.; Harvey, A. R. Cultured rat neuronal and glial cells entrapped within hydrogel polymer matrices: A potential tool for neural tissue replacement. *Neurosci. Lett.* 1996, 205, 197—201.
74. Plant, G. W.; Woerly, S.; Harvey, A. R. Hydrogels containing peptide or aminosugar sequences implanted in-

- to the rat brain; Influence on cellular migration and axonal growth. *Exp. Neurol.* 1997, 143, 287–299.
75. Suh, J. K. F.; Matthew, H. W. T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review. *Biomaterials* 2000, 21, 2589–2598.
 76. Madhally, S. V.; Matthew, H. W. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 1999, 20, 1133–1142.
 77. Bryant, S. J.; Anseth, K. S. The effects of scaffold thickness on tissue engineered cartilage in photocrosslinked poly (ethylene oxide) hydrogels. *Biomaterials* 2000, 22, 619–626.
 78. Cook, A. D.; Hrkach, J. S.; Gao, N. N.; Johnson, I. M.; Pajvani, U. B.; Cannizzaro, S. M.; Langer, R. Characterization and development of RGD-peptide-modified poly (lactic acid-co-lysine) as an interactive resorbable biomaterial. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997, 35, 513–523.
 79. Mann, B. K.; Schmedlen, R. H.; West, J. L. Tethered-TGF- β increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells. *Biomaterials* 2001, 22, 439–444.
 80. Bohl, K. S.; Shon, J.; Rutherford, B.; Mooney, D. J. Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1998, 9, 749–764.
 81. Weng, Y.; Cao, Y.; Silva, C. A.; Vacanti, M. P.; Vacanti, C. A. Tissue-engineered composites of bone and cartilage for mandible condylar reconstruction. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2001, 59, 185–190.
 82. Doretto, L.; Ferrara, D.; Gattolin, P.; Lora, S.; Schiavon, F.; Veronese, F. M. PEG-modified glucose oxidase immobilized on a PVA cryogel membrane for amperometric biosensor applications. *Talanta* 1998, 45, 891–898.
 83. Doretto, L.; Ferrara, D.; Lora, S.; Schiavon, F.; Veronese, F. M. Acetylcholine biosensor involving entrapment of acetylcholinesterase and poly (ethylene glycol)-modified choline oxidase in a poly (vinyl alcohol) cryogel membrane. *Enzyme Microb. Technol.* 2000, 27, 279–285.
 84. Veronese, F. M.; Mammucari, C.; Schiavon, F.; Schiavon, O.; Lora, S.; Secundo, F.; Chilin, A.; Guiotto, A. Pegylated enzyme entrapped in poly (vinyl alcohol) hydrogel for biocatalytic application. *Il Farmaco* 2001, 56, 541–547.
 85. Gaspar, S.; Popescu, I. C.; Gazaryan, I. G.; Bautista, A. G.; Sakharov, I. Y.; Mattiasson, B.; Csöregi, E. Biosensors based on novel plant peroxidases: A comparative study. *Electrochim. Acta* 2000, 46, 255–264.
 86. Patel, N. G.; Meier, S.; Cammann, K.; Chernitius, G. C. Screen-printed biosensors using different alcohol oxidases. *Sensors Actuators B* 2001, 75, 101–110.
 87. Wu, P.; Fisher, A. C.; Foo, P. P.; Queen, D.; Gaylor, J. D. S. In vitro assessment of water vapour transmission of synthetic wound dressings. *Biomaterials* 1995, 16, 171–175.
 88. Kietzmann, M. Improvement and retardation of wound healing; Effects of pharmacological agents in laboratory animal studies. *Vet. Dermatol.* 1999, 10, 83–88.
 89. Ulubayram, K.; Cakar, A. N.; Korkusuz, P.; Ertan, C.; Hasirci, N. EGF containing gelatin-based wound dressings. *Biomaterials* 2001, 22, 1345–1356.
 90. Loke, W. K.; Lau, S. K.; Yong, L. L.; Khor, E.; Sum, C. K. Wound dressing with sustained anti-microbial capability. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 53, 8–17.
 91. Higa, O. Z.; Rogero, S. O.; Machado, L. D. B.; Mathor, M. B.; Lugão, A. B. Biocompatibility study for PVP wound dressing obtained in different conditions. *Radiat Phys. Chem.* 1999, 55, 705–707.
 92. Razzak, M. T.; Darwis, D.; Sukirno, Z. Irradiation of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone blended hydrogel for wound dressing. *Radiat. Phys. Chem.* 2001, 62, 107–113.
 93. Yoshii, F.; Zhanshan, Y.; Isobe, K.; Shinozaki, K.; Makuuchi, K. Electron beam crosslinked PEO and PEO/PVA hydrogels for wound dressing. *Radiat. Phys. Chem.* 1999, 55, 133–138.
 94. Young, C. D.; Wu, J. R.; Tsou, T. L. High-strength, ultrathin and fiber-reinforced pH EMA artificial skin. *Biomaterials* 1998, 19, 1745–1752.
 95. Vert, M. Polyvalent polymeric drug carriers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1986, 2, 291–327.
 96. Kumar, M. N. V. R.; Kumar, N. Polymeric controlled drug-delivery systems; Perspective issues and opportunities. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2001, 27, 1–30.
 97. Peppas, N. A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000, 50, 27–46.
 98. Pillai, O.; Panchagnula, R. Polymers in drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2001, 5, 447–451.
 99. Levenfeld, B.; San Román, J.; Bunel, C.; Vairon, J. P. Polymers with pharmacological activity, 5. Hydrolytical behaviour of polymethacrylic hydrogels bearing “Paracetamol” side groups. *Makromol. Chem.* 1991, 192, 793–803.
 100. Korsmeyer, R. W.; Peppas, N. A. Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. III. Drug release from glassy poly (HEMA-co-NVP) copolymers. *J. Control. Rel.* 1984, 1, 89–98.

101. Lee, P. I. Kinetics of drug release from hydrogel matrices. *J. Control. Rel.* 1985, 2, 277—288.
102. Ritger, P. L.; Peppas, N. A. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J. Control. Rel.* 1987, 5, 37—42.
103. Korsmeyer, R. W.; Peppas, N. A. Macromolecular and Modeling Aspects of Swelling-Controlled Systems. In *Controlled Release Delivery Systems*; Roseman, T. J., Mansdorf, S. Z Eds; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1983; 77—90.
104. Crank, J. *The Mathematics of Diffusion*; Chapter 4, 2nd Ed.; Clarendon Press: Oxford, 1975; 4.
105. Brazel, C. S.; Peppas, N. A. Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers. *Polymer* 1999, 40, 3383—3398.
106. Blanco, M. D.; Gómez, C.; García, O.; Teijón, J. M. Ara-C release from poly (acrylamide-co-monomethyl itaconate) hydrogels; In vitro and in vivo studies. *Polym. Gels Networks* 1998, 6, 57—69.
107. Blanco, M. D.; García, O.; Trigo, R. M.; Teijón, J. M.; Katime, I. 5-Fluorouracil release from copolymeric hydrogels of itaconic acid monoester. I. Acrylamide-co-monomethyl itaconate. *Biomaterials* 1996, 17, 1061—1067.
108. Vakkalanka, S. K.; Brazel, C. S.; Peppas, N. A. Temperature and pH -sensitive terpolymers for modulated delivery of streptokinase. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1996, 8, 119—129.
109. Serres, A.; Baudys, M.; Wankim, S. Temperature and pH -sensitive polymers for human calcitonin delivery. *Pharm. Res.* 1996, 13, 196—201.
110. Varshosaz, J.; Falamarzian, M. Drug diffusion mechanisms through pH -sensitive hydrophobic/polyelectrolyte hydrogel membranes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2001, 51, 235—240.
111. Podual, K.; Doyle, F. J., III; Peppas, N. A. Glucose-sensitivity of glucose oxidase-containing cationic copolymer hydrogels having poly (ethylene glycol) grafts. *J. Control. Release* 2000, 67, 9—17.
112. Goldbart, R.; Kost, J. Calcium responsive bioerodible drug delivery system. *Pharm. Res.* 1999, 16, 1483—1486.
113. Suzuki, Y.; Tanihara, M.; Nishimura, Y.; Suzuki, K.; Kakimaru, Y.; Shimizu, Y. A new drug delivery system with controlled release of antibiotic only in the presence of infection. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, 42, 112—116.
114. Miyazaki, T.; Asami, N.; Uragami, T. A reversible antigenresponsive hydrogel. *Nature* 1999, 399, 765—769.
115. Nagai, T.; Machida, Y. Buccal delivery systems using hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1993, 11, 179—191.
116. Peppas, N. A.; Buri, P. A. Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *J. Control. Release* 1985, 2, 257—275.
117. Wong, C. F.; Yuen, K. H.; Peh, K. K. Formulation and evaluation of controlled release Eudragit buccal patches. *Int. J. Pharm.* 1999, 178, 11—22.
118. Soane, R. J.; Frier, M.; Perkins, A. C.; Jones, N. S.; Davis, S. S.; Illum, L. Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. *Int. J. Pharm.* 1999, 178, 55—65.
119. Zhao, X.; Kato, K.; Fukumoto, Y.; Nakamae, K. Synthesis of bioadhesive hydrogels from chitin derivatives. *Int. J. Adhes. Adhes.* 2001, 21, 227—232.
120. Quintanar-Guerrero, D.; Villalobos-Garcia, R.; Alvarez-Colin, E.; Cornejo-Bravo, J. M. In vitro evaluation of the bioadhesive properties of hydrophobic polybasic gels containing *N, N*-dimethylaminoethyl methacrylate-co-methyl methacrylate. *Biomaterials* 2001, 22, 957—961.
121. Lehr, C. M. Lectin-mediated drug delivery: The second generation of bioadhesives. *J. Control. Release* 2000, 65, 19—29.
122. Torres-Lugo, M.; Peppas, N. A. Molecular design and in vitro studies of novel pH -sensitive hydrogels for the oral delivery of calcitonin. *Macromolecules* 1999, 32, 6646—6651.
123. Shantha, K. L.; Harding, D. R. K. Preparation and in vitro evaluation of poly (*N*-vinyl-2-pyrrolidone-polyethylene glycol diacrylate)-chitosan interpolymeric pH -responsive hydrogels for oral drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2000, 207, 65—70.
124. Maris, B.; Verheyden, L.; Van Reeth, K.; Samyn, C.; Augustijns, P.; Kinget, R.; Van den Mooter, G. Synthesis and characterisation of inulin-azo hydrogels designed for colon targeting. *Int. J. Pharm.* 2001, 213, 143—152.
125. Stubbe, B.; Maris, B.; Van den Mooter, G.; De Smedt, S. C.; Demeester, J. The in vitro evaluation of “azo containing polysaccharide gels” for colon delivery. *J. Control. Release* 2001, 75, 103—114.
126. Blanco, M. D.; García, O.; Gómez, C.; Sastre, R. L.; Teijón, J. M. In vivo drug delivery of 5-fluorouracil using poly- (2-hydroxyethyl methacrylate-co-acrylamide) hydrogels. *J. Pharm. Pharmacol.* 2000, 52, 1319—1325.
127. Blanco, M. D.; Trigo, R. M.; Teijón, C.; Gómez, C.; Teijón, J. M. Slow releasing of ara-C from poly (2-

- hydroxyethyl methacrylate) and poly (2-hydroxyethyl methacrylate-*co*- *N*-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels implanted subcutaneously in the back of rats. *Biomaterials* 1998, 19, 861—869.
128. Alvarez-Figueroa, M. J.; Blamco-Méndez, J. Transdermal delivery of methotrexate: Iontophoretic delivery from hydrogels and passive delivery from microemulsions. *Int. J. Pharm.* 2001, 215, 57—65.
129. Wang, Y. Y.; Hong, C. T.; Chiu, W. T.; Fang, J. Y. In vitro and in vivo evaluations of topically applied capsaicin and nonivamide from hydrogels. *Int. J. Pharm.* 2001, 224, 89—104.
130. Thacharodi, D.; Rao, K. P. Development and in vitro evaluation of chitosan-based transdermal drug delivery systems for the controlled delivery of propranolol hydrochloride. *Biomaterials* 1995, 16, 145—148.

(罗华菲 译)

T

肽类和蛋白质类药物的口服吸收

Eugene J. McNally

Jung Y. Park

Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., Ridgefield, Connecticut, U. S. A.

引言

生物技术的迅猛发展促使多肽 (>3 个氨基酸) 和蛋白质类药物成为药剂学家们面临的新挑战。虽然这些蛋白质和多肽类药物具有高效而专一的生理活性, 但是它们的口服给药却极其困难。因为大多数多肽和蛋白质在胃肠道 (GI) 中不稳定, 并且受其本身的分子大小和亲水性 (也有例外, 如环孢菌素) 的限制, 口服吸收较差。从文献中的数据和对黏膜通透性的了解可知, 尽管每种非注射给药途径都各有优势和不足, 但却是多肽和蛋白质类药物比较适合的给药方式。鼻腔是多肽和蛋白质给药的最佳途径, 其余依次为阴道、肺部、口腔和皮肤。众所周知, 多肽和蛋白质类药物容易被胃肠道中的酸和酶水解、消化。另外, 这类药物在胃肠道中的透膜能力较差, 生物利用度较低。

口服多肽和蛋白质类药物, 必须将这类药物保护起来, 使其不受胃肠道环境的影响。在科学和专利文献中曾经报道过多种方法, 比如联用非特异性蛋白酶抑制剂或者进行化学修饰来增强对酶降解的抵抗力。近年来出现了许多专门研究蛋白质输送系统的公司。这些公司正尝试用改进处方来保护蛋白质药物避免被胃肠道中的酶降解, 如脂质体或微球, 或者对结肠或直肠进行定位给药从而绕过不利的胃肠道环境。另外, 为了促进胃肠道对多肽和蛋白质的吸收, 使用吸收促进剂、载体或者前药的方法也正在探索之中。

本章的目的有以下六个:

- (1) 回顾与药物的吸收有关的胃肠道的生理结构;
- (2) 简单介绍多肽和蛋白质的结构;
- (3) 总结多肽和蛋白质类药物经胃肠道吸收的酶和物理屏障;
- (4) 阐明氨基酸、肽类和蛋白质通过胃肠道的吸收;
- (5) 总结吸收促进剂的种类和作用机制;
- (6) 综述改善肽类和蛋白质类药物低生物利用度的可行方法。

与吸收有关的胃肠道生理学特征

理解多肽和蛋白质的胃肠道吸收情况需要了解胃肠道的一些知识, 如形态学、细胞不同成分的功能、几何学、超微结构、生化过程、肠腔内的水流体动力学和转运机制等。

1. 消化系统

消化系统由从口腔到肛门的管道 (咽喉、食道、胃、小肠和大肠) 及相关器官 (唾液腺、肝脏、胆囊和胰腺) 组成 (图 1)。小肠分为三部分, 即十二指肠、空肠和回肠, 是大部分药物吸收的主要场所。大肠, 也称作结肠, 分为盲肠、升结肠、横结肠、降结肠、乙状结肠、直肠和肛门。唾液腺、肝脏、胆囊和胰腺转运消化液, 并且有助于多肽和蛋白质类药物的消化和吸收。

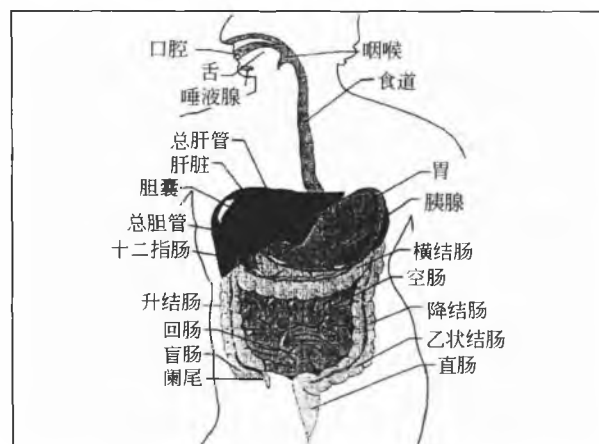


图 1 人体消化系统

1.1 胃

胃的内壁由清晰的组织层构成: 肌肉层、黏膜下层和黏膜层。胃的吸收功能最弱, 因为它表面积小、没有绒毛、黏膜层厚、停留时间短。胃黏膜上皮分泌盐酸、胃蛋白酶、内因子和碳酸氢盐。胃液中由于含有盐酸而 pH 较低, 从而导致了蛋白质的降解 (展开), 这使蛋白质更多的肽键暴露在胃蛋白酶下, 分解为肽类。但是因为胃蛋白酶只能分解特定氨基酸间的肽键, 蛋白质在胃中的水解不完全。

1.2 小肠

食物中大分子的水解大多发生在小肠。小肠长约 5m, 半径约 2cm, 在解剖学上可以分为三部分: 十二指肠 (最前端 25cm)、空肠 (中间 2.0m) 和回肠 (最后 2.75m)^[1]。肠的膜壁由四个基本层构成: 黏膜层、黏膜下层、肌肉层和浆膜。

构成小肠肠腔表面的黏膜层与小肠的消化和吸收功能有关。由于小肠表面的环状褶皱, 黏膜表面积比预计的简

单的圆柱大得多。黏膜表面区域被指状凸起（绒毛）和凹陷（小囊）进一步延伸。绒毛高 0.5~1.0mm，绒毛和小囊由上皮细胞排列而成，这些上皮细胞表面都覆盖了紧密排列、凸向小肠腔的微绒毛。如果小肠被看做一个简单的圆柱体，那么小肠黏膜表面的面积大概只有 0.5m²。而实际

上小肠黏膜的表面积约为 250m²，相当于一个网球场的大小。

黏膜表面：小肠黏膜由三层构成（图 2）：吸收层，连续的单层柱状上皮；固有层，由不同的成分和细胞类型构成；肌黏膜，将黏膜层和黏膜下层分开的肌肉层。

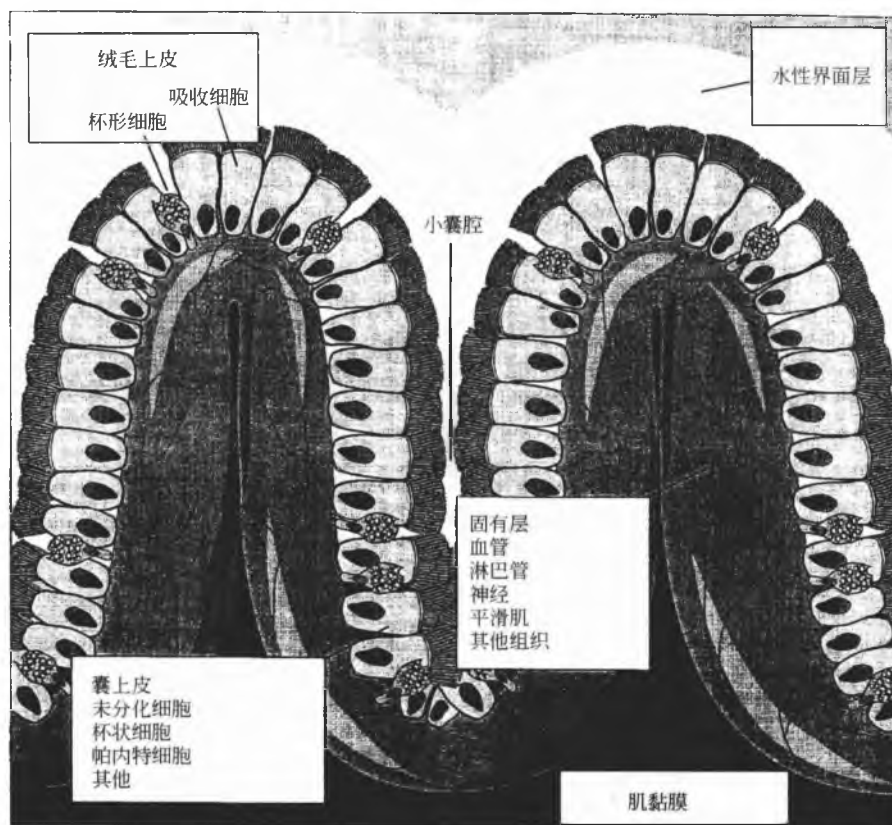


图 2 小肠黏膜的绒毛和小囊示意图。图中还示意了在肠腔和膜界面的水性层

固有层主要由结缔组织构成，支持上皮内层。有充分的证据表明固有层的淋巴细胞及其相关结构在免疫上发挥了重要的作用。小肠上端有淋巴小结，而大的淋巴组织聚集体（集合淋巴小结）在回肠中。淋巴细胞、淋巴结、固有层的集合淋巴小结以及上皮细胞之间的淋巴球共同构成了肠相关淋巴样组织（GALT），它是免疫系统的一个主要分支，并且覆盖了 25% 的胃肠道黏膜。

单层上皮细胞覆盖在绒毛和小囊的表面。小肠上皮细胞的类型有肠细胞（消化和吸收）、杯状细胞（分泌黏液）、内分泌细胞（分泌激素）和 M 细胞（吸收食物和抗原）。

吸收细胞：吸收细胞（通常称为肠细胞或刷状缘细胞）是绒毛尖端最常见的细胞类型，并且对吸收起最重要的作用（图 3）。在人体中，这些细胞高 20~30μm，宽 8~10μm。这种细胞的黏膜表面有微绒毛（刷状缘，高约 1.0μm，宽 0.1~0.2μm）。微绒毛如图 3 所示，看上去像一把刷子，所以肠上皮吸收细胞的微绒毛边缘被称为刷状缘。微绒毛的

质膜是由蛋白质、中性脂质、磷脂和糖脂组成的三层结构（厚度为 70~90Å）。质膜中完整和动态的部分是细胞被膜。细胞被膜层由纤维状糖蛋白均匀构成（图 4）^[2]。由于碳氢链末端存在唾液酸，细胞被膜层在生理 pH 条件下带负电荷。微绒毛和细胞被膜是肠细胞消化吸收的单元。微绒毛的质膜中有一些特殊的蛋白质，这些蛋白质有酶、受体和转运的性能，因而蛋白质-脂质比例非常高。微绒毛质膜中含有许多参与肽类水解的酶（肽酶），以及与同时转运钠和氨基酸有关的蛋白质，在小肠不同部位的肠细胞微绒毛里还发现了转运特定物质的载体蛋白。比如，在回肠肠细胞的微绒毛里发现了内因子-维生素 B₁₂ 复合物的受体，而在空肠却没有发现，这就是维生素 B₁₂ 只在回肠吸收的原因。通过将维生素 B₁₂ 与肽类（促黄体激素释放激素，LHRH）或者蛋白质（牛血清白蛋白，BSA）共价结合，维生素 B₁₂ 可以作为肽类和蛋白质的转运系统^[3]。

T

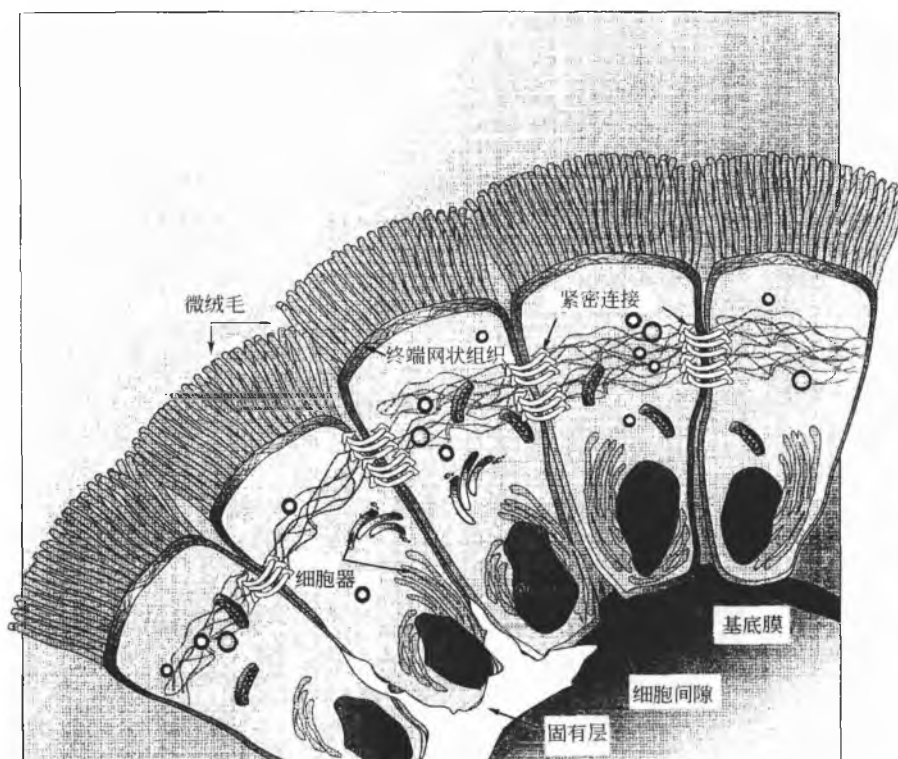


图3 小肠上皮吸收细胞的示意图

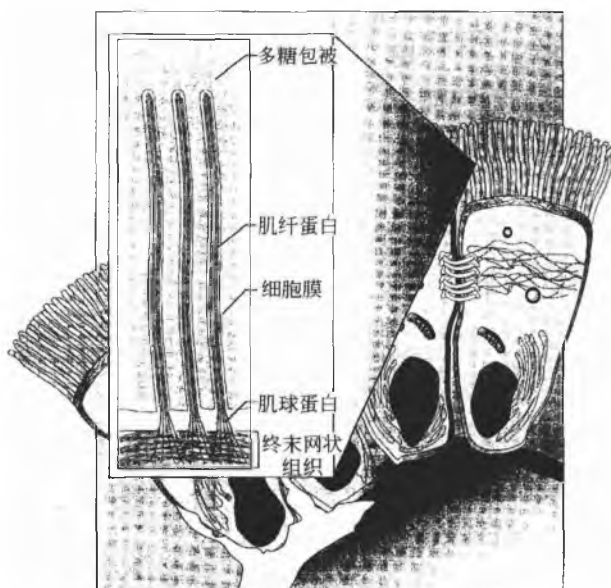


图4 细胞被膜的示意图

吸收细胞的基底膜在固有层上。基底膜不同于顶膜，其蛋白质-脂质比例低，并且比顶膜薄、通透性较好。另外，基底膜所含酶的种类也与顶膜不同。相邻的细胞通过一种叫做紧密连接的连接复合物相连。紧密连接非常重要，因为它代表一种肠吸收途径，即细胞间转运途径。另外一种主要途径是穿过细胞，即已知的跨细胞通路。这些途径

将在稍后讨论。

水边界（扩散）层：水边界（扩散）层（通常也称为静止层、不流动层或水扩散层）是药物到达黏膜表面时必须穿越的重要流体动力学屏障^[4]。肠腔中的分子跨膜之前，必须穿越位于肠腔和膜界面上的水边界层（图2）。实际上，水边界层上的液体并不是静止的，称其为“不流动”层，仅是代表扩散和自然对流混合发生于表面的膜层。这个静止层是疏水性分子吸收的限速步骤。而亲水性分子如肽类在通过静止层时遇到的阻力较小。在绒毛的尖端，水边界层的有效厚度要薄一些，而在绒毛的末端则要静止并厚一些。水边界层的存在在生理上是合理的，并且可以通过实验证明^[5]。

多肽和蛋白质在腔内和膜中的代谢：在对小肠吸收肽类和蛋白质类药物的研究中发现，必须首先区分腔内的、与膜接触的和细胞内的药物代谢^[4]。腔内代谢发生在小肠肠腔中，通过胰腺分泌的酶进行，如胰蛋白酶、糜蛋白酶、羧肽酶和弹性蛋白酶等。膜接触代谢是通过刷状缘膜上的氨肽酶进行的。细胞内代谢在细胞内进行。已知的细胞内酶有细胞质的肽酶、脯氨酰氨酶、二肽酶和三肽酶等^[1]。这一主题将在后面“肠吸收屏障”中讨论。

肠的血流：目前肠的血流与肠黏膜吸收、分泌、代谢活性之间的关系尚未明确。但是有资料显示，血液流速的减慢与药物吸收速度的降低有关。血液流速的减慢降低了药物吸收速度的假说有：①缓慢地带走药物分子，降低了分子被动转运通过上皮层的有效浓度梯度；②降低了细胞

维持主动转运吸收药物所需的氧供应。

总之,当分子通过上皮细胞层直接转运至小肠的肠系膜血管时,总的转运阻力可以用一系列屏障(膜前水边界层、膜本身、血管旁的水边界层)阻力的和来表示^[6]:

$$\frac{1}{P_{app}} = \frac{1}{P_{aq}} + \frac{1}{P_{membrane}} + \frac{1}{P_{blood}} \quad (1)$$

式中: P_{app} 为表观渗透系数; P_{aq} 为水边界层渗透系数; $P_{membrane}$ 为膜的渗透系数; P_{blood} 为血液边界层的渗透系数。

当水边界层和膜的渗透系数比较大时,血液流速的减慢成了限速步骤。例如,当 P_{aq} 和 $P_{membrane}$ 各是 P_{blood} 的十倍左右时,表观渗透系数约 85% 受血液流速控制。

1.3 大肠(结肠)

大肠(结肠)可以分为五部分:①盲肠,结肠的端口;②升结肠,大肠的第二段;③横结肠;④降结肠;⑤乙状结肠,结肠的末端,止于直肠(图1)。大肠长约 1.5m,直径约 2in。与小肠一样,大肠壁分为四层:浆膜、肌肉层、黏膜下层和黏膜层。然而,黏膜不含绒毛和微绒毛,并且细胞要比小肠疏松得多。它也含有大量细菌,可以将食物残渣消化成能量物质,然后被吸收。大肠中的细菌总量比胃和小肠中的多。有人尝试用对偶氮还原酶敏感的共聚物包被药物颗粒,再经结肠给药^[7]。另外,由于结肠的蛋白水解酶活性较低,所以结肠部位的肽类和蛋白质给药引起了人们的关注。

1.4 直肠

直肠位于大肠末端,长 15~19cm。直肠的黏膜层由一层柱状上皮细胞构成,不含绒毛。直肠的 pH 在 7.2~7.4,表面积只有 200~400cm²。药物通过黏膜下丛的三个静脉吸收。直肠上静脉进入门静脉并将药物运送至肝脏。直肠下静脉和直肠中静脉与下腔静脉相通,绕开了肝脏,因而通过直肠黏膜转运一些肽类和蛋白质具有一定的优势。

肽类和蛋白质的结构与功能

设计合理的处方使肽类和蛋白质成功口服,除需要了解胃肠道的形态学和功能之外,全面了解肽类和蛋白质的结构和功能也是十分重要的。本章对此不展开综述(见本章的其他部分及关于蛋白质的处方和输送的另一章^[8])。本章仅对肽类和蛋白质进行简单的描述,重点介绍与其独特的生物活性相关的性质。肽类是由相邻氨基酸的—NH₂和—COOH 基团脱水而形成。根据组成肽类的氨基酸的数目被命名为二、三、四肽等。寡肽是指少于八个氨基酸的肽,含八个或八个以上氨基酸的肽称为多肽。多肽中的每一个氨基酸单元被称为氨基酸残基。含有约 50 (相对分子质量≈8000) 到 8000 (相对分子质量≈1 000 000) 个以上氨基酸残基的多肽被称为蛋白质^[9]。每个蛋白质分子都是由 α-氨基酸通过肽键有序连接形成的聚合物。尽管在自然界中,尤其在植物中存在含 100 个以上氨基酸的蛋白质,但是大

多数蛋白质中通常包含 20 个氨基酸。

蛋白质是自然界中主要的有机化合物之一,它构成了许多动植物的组织。Protein 这个词来源于希腊语 *proteios*,表示第一位,因为蛋白质被认为是活体最重要的部分,几乎在细胞所有的活动中都发挥作用,在大多数细胞干重中所占的比例超过了 50%^[9]。蛋白质可以作为抗体、酶、激素、转运载体和结构要素等。

和传统的小分子化学药物不同,肽类尤其是蛋白质药物是极其复杂的分子,有一级、二级、三级和四级结构。一级结构是组成蛋白质或肽类的氨基酸的线性排列顺序。二级结构指的是肽链骨架片断定向成常见模式的方式,如 α-螺旋和 β-折叠。三级结构是指蛋白质的天然构象,即通过将二级结构折叠成紧密的结构来达到热力学稳定状态。当蛋白质由两个或两个以上的多肽链组成时,会出现四级结构^[10]。

蛋白质的生物功能取决于其独特的构象。这种构象是由组成多肽链的氨基酸的特殊排列顺序(一级结构)及蛋白质特殊的三维结构(构象)引起的。一般来说,非极性基团倾向于避开水而折向结构的中心,极性基团倾向于留在表面与水接触。为保持蛋白质药物的生物活性,在经过胃肠道及其吸收过程中,必须保持这种独特的高度有序的物理结构。化学和物理结构上的微小改变都将导致生物活性的降低。

肠吸收屏障

1. 酶屏障

大多数食用蛋白质在人体内不能以原型吸收,通常在胃肠道内首先被分解为氨基酸或二肽和三肽。由胃分泌的胃蛋白酶原,在酸的作用下可以转化为有活性的胃蛋白酶。胃蛋白酶在 pH 2~3 的条件下活性最高,可以水解部分消化的食用蛋白质。这些部分消化的食用蛋白质再被水解酶(肽酶)继续分解,水解酶由胰腺产生、十二指肠分泌。裂解内部肽链的肽酶叫做内肽酶,而破坏末端氨基酸基团的叫做外肽酶。内肽酶有胰蛋白酶、糜蛋白酶和弹性蛋白酶,外肽酶只有羧肽酶^[1]。这四种酶(胰蛋白酶、糜蛋白酶、羧肽酶和弹性蛋白酶)都是由胰腺分泌为无活性的酶原,即胰蛋白酶原、糜蛋白酶原、羧肽酶原和弹性蛋白酶原。胰蛋白酶原由小肠肠腔的肠激酶(也叫肠肽酶)转化为胰蛋白酶。然后胰蛋白酶将糜蛋白酶原、羧肽酶原和弹性蛋白酶原分别转化为糜蛋白酶、羧肽酶和弹性蛋白酶^[1]。这些酶的功能是在体内将食物中的蛋白质转变为可以吸收和转化成能量的氨基酸,同时它们也会降解蛋白质药物。了解这些酶的功能和分泌场所是非常重要的,因为可以由此制定保护蛋白质药物不被降解的策略。

由胰腺分泌的这四种肽酶可以将蛋白质和多肽转化为寡肽。在一定的小肠片断内,肠腔降解可以达到总降解的 20%^[11],其余降解在与刷状缘膜接触或进入细胞后进行。



T

刷状缘的肽酶,如氨基寡肽酶、氨基肽酶和二肽氨基肽酶,将寡肽降解为氨基酸(70%)和二肽、三肽(30%)^[1]。通过刷状缘膜的二肽和三肽可以被细胞内的酶,如细胞质肽酶、氨酰基脯氨酸酶、二肽酶和三肽酶,分解为简单氨基酸^[1]。

改善肽类和蛋白质药物的口服吸收,必须克服以上提到的酶屏障。可以联用酶抑制剂或者对肽类和蛋白质药物进行化学修饰,也可以应用其他的处方方法(见后文“肠对氨基酸、肽类和蛋白质的吸收”)。

2. 物理屏障

吸收屏障与药物分子穿过胃肠道膜(包括结肠膜)的通透能力有关。分子跨膜有两个不同的机制:细胞间转运和跨细胞转运(图5)^[12]。细胞间转运仅发生在分子通过上皮细胞间的紧密连接进行的被动扩散中。而跨细胞转运可以发生在被动扩散、主动转运和内存作用中。通常,亲水性分子主要通过细胞间途径扩散,而亲脂性分子主要是横穿上皮细胞。

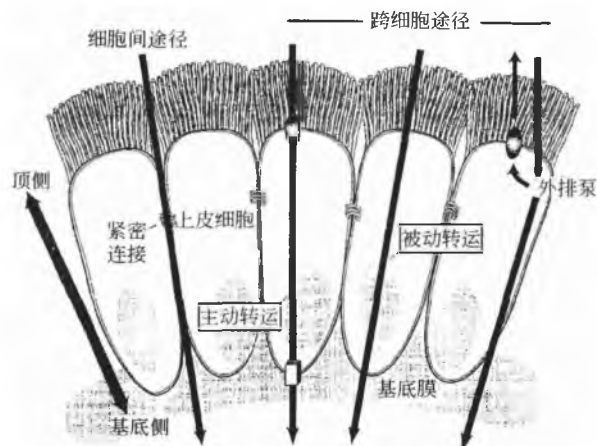


图5 药物通过胃肠道上皮细胞转运的途径

2.1 跨细胞转运

穿过肠上皮细胞的转运包括三个过程:简单被动扩散,被动扩散和外排泵,主动转运和内存。简单的被动扩散是分子在热力学动力下进行的跨膜扩散,不消耗能量。相反,主动转运是分子消耗能量并逆浓度梯度进行转运的跨膜运动。内存过程包括三个机制:液相内存作用(胞饮)、受体介导的内存作用和跨细胞作用(图6)。内存过程将在稍后的“多肽和蛋白质药物的吸收”中详细介绍。

药物在胃肠道中吸收的机制很复杂。理解肠的转运机制是预测药物口服吸收的关键。其物理模型^[13~15]利用了热力学和传质的基本原理。药物在肠腔内同时进行被动和主动转运的物理模型如图7所示:黏膜侧是大量有水边界层的水溶液;旁边紧挨着一系列均质膜,膜由平行排列的类脂和被动或主动转运的亲水性通道组成;其后是浆膜侧的漏槽。

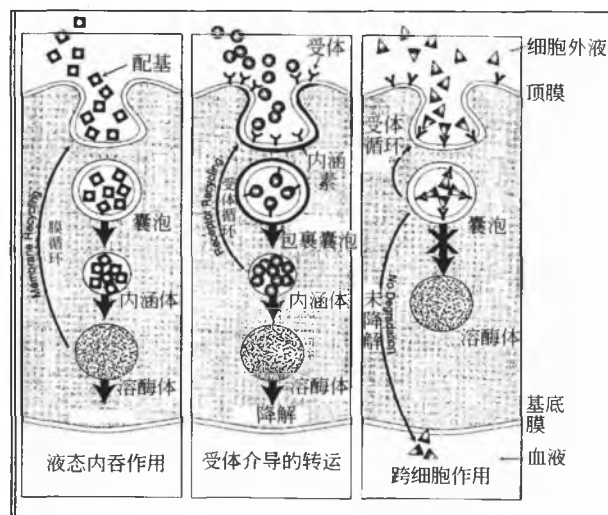


图6 细胞吸收和机理示意图:液态内存,受体介导的内存和跨细胞转运

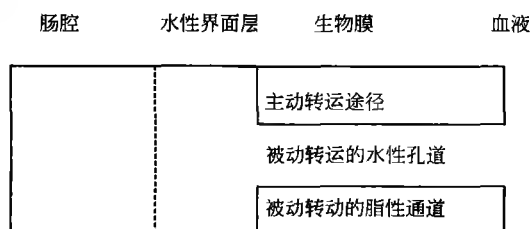


图7 药物在肠腔中同时被动和主动膜转运的物理模型

药物从肠腔转移到血液中的速率可用下式表示:

$$\frac{dC_b}{dt} = -\frac{A}{V} P_{app} (C_b - C_{blood}) \quad (2)$$

当药物不在血液侧累积,即漏槽条件下:

$$\frac{dC_b}{dt} = -\frac{A}{V} P_{app} C_b = -K_u C_b \quad (3)$$

$$K_u = \frac{A}{V}$$

式中: C_b 为肠腔中药物的总浓度; P_{app} 为一级吸收方程的表观速率常数; A 为表面积; V 为腔中的溶液体积。

假设血液侧无明显的水边界层,则方程(1)的表观渗透系数(P_{app})可以表示为

$$P_{app} = \frac{1}{\frac{1}{P_{aq}} + \frac{1}{P_{membrane}}} \quad (4)$$

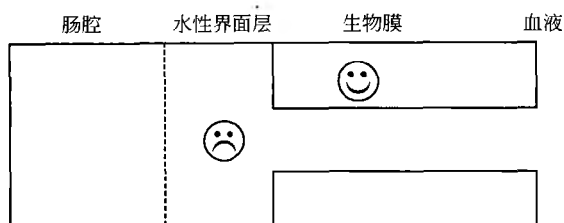
由方程(4)可得,吸收速率常数为

$$K_u = \frac{A}{V} \cdot \frac{1}{\frac{1}{P_{aq}} + \frac{1}{P_{membrane}}} \quad (5)$$

对于脂溶性强的药物($-\log PC > 3.0$),吸收速率常数取决于穿过膜前水边界层的扩散速度,可以表示为

$$K_u = \frac{A}{V} \cdot P_{ac} \quad (6)$$

也可以用下图描述:



对于肽类和蛋白质等亲水性药物, 吸收速率常数取决于透膜扩散 ($P_{aq} \gg P_{membrane}$):

$$K_u = \frac{A}{V} \cdot P_{membrane} \quad (7)$$

表 1 列举了各种转运机制中有效膜渗透系数的其他数学表达式。

表 1 不同转运机制的有效膜渗透系数

机 制	$P_{membrane} =$
小分子电解质的被动扩散	$P_L X_S + P_P$
小分子非电解质的被动扩散	$P_L + P_P$
大分子非电解质的被动扩散	P_L
两性电解质的被动转运	$P_L^+ X_S^+ + P_P^+ X_S^+ + P_P^- X_S^-$
被动扩散与主动转运同时发生	$P_L X_S + P_L^* (1 - X_S)$, 其中 $P_L^* = J_{max}^* / K_L^*$

注: P_L 为脂质膜的渗透系数; P_P 为水性孔道的渗透系数; X_S 为未解离组分的分数; P_L^+ 为中性分子脂质膜的渗透系数; P_P^+ 、 P_P^- 分别为带正电组分、带负电组分水性孔道的渗透系数; X_S^+ 、 X_S^- 和 X_S 分别为膜表面中性组分、带正电组分和带负电组分的分数; P_L^* 为主动转运的膜渗透系统; J_{max}^* 为主动转运的最大流量; K_L^* 为主动转运的米氏常量。

在过去的十年中, 关于 P-糖蛋白的报道屡见不鲜。P-糖蛋白分子质量为 170kDa, 是肿瘤细胞多向性抗药 (MDR) 的主要成分, 起到了顶端极性外排转运体 (也称外排泵) 的作用。外排转运体与药物在上皮细胞的跨细胞运动相抗衡。P-糖蛋白在肾、肝和胃肠道上皮细胞的顶部区域。许多药物, 如环孢菌素 A^[16] 和其他肽类^[17] 都是外排泵的底物。肽类外排泵的存在可以利用 Caco-2 细胞培养模型, 通过测量有与没有外排泵抑制剂的情况下, 肽类的表观渗透系数 (P_{app}) 来衡量。当有外排泵抑制剂 (氯丙嗪和黄体酮) 时, 同对照组 (无抑制剂) 相比, 环孢菌素 A 从顶部向基底部转运的 P_{app} 值明显增大; 相反, 从基底部向顶部的转运减少。环孢菌素 A 是外排泵 P-糖蛋白的底物, 且外排泵位于肠上皮细胞的顶端。当观测到无法解释的肽类吸收较低的现象时, 就需要考察外排泵的作用。

2.2 细胞间转运

细胞间转运的主要屏障是紧密连接, 也称密闭小带。紧密连接在密封上皮细胞的间隙中起了重要作用^[18]。这些

紧密连接位于刷状缘下, 并在邻近的上皮细胞之间形成了封条。紧密连接就如同门和篱笆, 控制分子在细胞间的运动。另外, 紧密连接还能够阻止一定的顶部和基底质膜蛋白质的自由扩散和混合, 从而引起上皮细胞层的极化。这些连接是由成对的膜内链组成的, 链由脂类分子和一些蛋白质组成, 如 occludin、claudin-1 和 claudin-2。在研究其表达中发现, claudin-1 和 claudin-2 可能与封闭紧密连接更有关, 而 occludin 在调节紧密连接的功能时起支持作用^[19]。链中含有许多分散的亲水性孔道^[12]。紧密连接带有固定的负电荷, 如在相邻细胞膜的糖蛋白和蛋白聚糖表面有 COO^- 、 SO_4^{2-} 和 PO_4^{3-} ^[20]。由于紧密连接带负电, 所以这一屏障具有阳离子选择性。通常, 阳离子通过紧密连接扩散的速度比阴离子快^[21]。肠黏膜紧密连接的半径是肽类和蛋白质药物细胞间转运的关键因素。紧密连接的半径约为 12\AA ^[22]。受紧密连接大小的限制, 只有小分子和离子能够通过细胞间扩散。氨基酸、二肽和三肽的分子较小, 可能可以经细胞间途径穿过肠壁吸收; 而多肽和蛋白质体积较大, 受到限制。

克服这种扩散限制的方法之一是应用促进剂来改变紧密连接的亲水性孔道的半径。许多促进剂可以用于增加肠膜的通透性, 大致分为两类: 阴离子表面活性剂, 如长链酰基肉毒碱、胆酸、十二烷基硫酸二钠和奎酸钠等; 钙的螯合剂, 如 EDTA 和柠檬酸盐等^[17]。钙螯合剂降低了钙的浓度, 从而导致紧密连接的开放。阴离子表面活性剂通过与细胞膜的相互作用而打开紧密连接。在考虑促进剂有利方面的同时, 考虑可能引起对膜的长期不可逆损伤也是十分重要的。关于促进剂毒理学方面的研究报道很少。一般来说, 非离子表面活性剂的毒性比离子表面活性剂低, 但是离子表面活性剂的促进作用较强。

评价肠黏膜渗透性的技术

用于评价药物分子跨肠膜渗透能力的技术很多, 如外翻囊法 (everted sacs)^[23]、刷状缘膜囊泡法^[24]、肠环法 (intestinal rings)^[24]、再循环法^[25]、改良在体 Doluisio 技术^[4]、在体循环法^[26]、Caco-2 细胞培养模型^[17]、人体插管法^[27]等。在过去的十年中, 细胞培养模型 (图 8) 在医药工业领域受到极大的关注。这种结肠癌细胞系模型可以模拟肠上皮细胞并用于估计分子的渗透性^[17]。Caco-2 细胞培养模型已成为筛选组合化学产物的常规工具。

在 Caco-2 细胞实验中, 表观渗透系数 (P_{app}) 的计算公式为

$$P_{app} = \frac{1}{AC_{d,0}} \cdot \frac{dM}{dt} \quad (8)$$

式中: $C_{d,0}$ 为药物在供给侧的初始浓度; M 表示 t 时间药物在接受侧的量。

方程 (9) 进一步定义了表观渗透系数:

$$\frac{1}{P_{app}} = \frac{1}{P_{aq}} + \frac{1}{P_{mono}} + \frac{1}{P_F} \quad (9)$$

式中： P_F 为滤器的渗透系数； $P_{\text{单层}}$ 为单层 Caco-2 细胞的渗透系数。

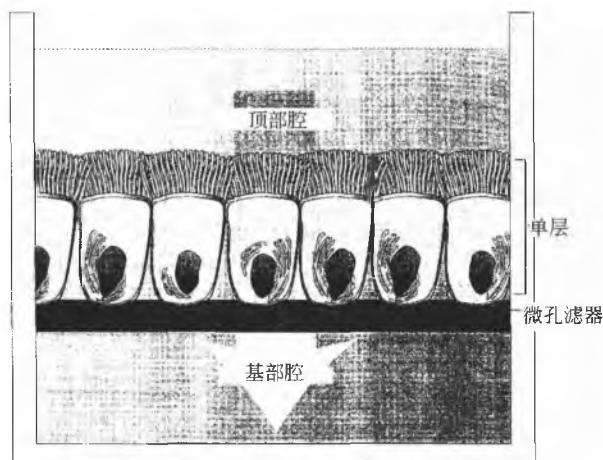


图8 Caco-2 细胞的示意图

肠对氨基酸、肽类和蛋白质的吸收

目前关于胃肠道对食物中的氨基酸和肽类摄取方面的知识了解得较多。对这些信息进行综述是非常有意义的，因为其有助于深入了解肽类和蛋白质药物的吸收机制。

1. 氨基酸的吸收

回肠对单个氨基酸的摄取比空肠活跃得多。肠细胞膜中有许多不同的氨基酸载体。氨基酸在特定氨基酸载体的帮助下通过刷状缘质膜进入上皮细胞吸收。B、 B^{0+} 、IMINO、 β 和 X_{AG} 型载体是钠依赖性的， b^{0+} 和 y^+ 型载体是不依赖于钠的载体^[1]。钠依赖性载体只有在结合了钠以后才可以与氨基酸结合。与氨基酸结合的载体经过构象转变，将钠和氨基酸转运到细胞内侧，然后载体恢复至原来的构象。吸收细胞的基底膜还含有其他载体，可以将氨基酸从细胞转运至血液中。基底膜的氨基酸载体可以分为钠依赖性的 A 和 ASC 型载体以及不依赖钠的 asc、L 和 y^+ 型^[1] 载体。

X_{AG} 型载体用于转运酸性氨基酸，碱性氨基酸则主要由 y^+ 型载体转运。A 和 IMINO 型载体有助于脯氨酸和羟基脯氨酸的转运。其他载体 (B、 B^{0+} 、 β 、 b^{0+} 、ASC、asc、L) 主要转运中性氨基酸。肠对氨基酸的吸收具有立体化学专一性。当氨基酸的外消旋混合物进入小肠时，左旋异构体的吸收速率要大于相应的右旋异构体^[28]。

2. 小分子肽类的吸收

蛋白质经蛋白水解酶、胰腺和刷状缘的肽酶水解后，

二肽和三肽都通过上皮细胞膜吸收。多项研究表明二肽和三肽可以通过特殊的载体系统，主动转运跨过上皮细胞膜，以原型吸收。吸收过程由位于肠顶部细胞膜上的氢键偶合肽转运体 (PEPT1) 介导^[29]。由于氨基酸有 20 多种，所以可能存在分子大小和电荷各异的二肽 400 种和三肽 8000 种。这意味着单膜转运系统对二肽和三肽有高度亲和力，但对四肽和寡肽的亲合力较低。肽样药物，如血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂、抑氨肽毒素 b、头孢菌素、 β -内酰胺类抗生素和肾素抑制剂，结构与小分子肽相似，所以可以被肽转运体识别。一旦进入肠细胞，大多数的二肽和三肽被细胞内的肽酶消化为氨基酸，并从细胞转运至血液中。只有少数小分子肽以原型入血。不被细胞质肽酶水解的肽在基底部肽转运体的帮助下，通过基底细胞膜。关于基底部的肽转运体的研究较少。 Na^+/H^+ 交换体可以保持顶膜侧的质子梯度，而基底膜的 Na^+/K^+ -ATP 酶保持了细胞内钠的低浓度。因此 Na^+/H^+ 交换体与 Na^+/K^+ -ATP 酶结合，驱使二肽和三肽跨上皮细胞转运 (图 9)。肠肽转运体 PEPT1 可以转运二肽和三肽，但不能转运氨基酸和四肽。

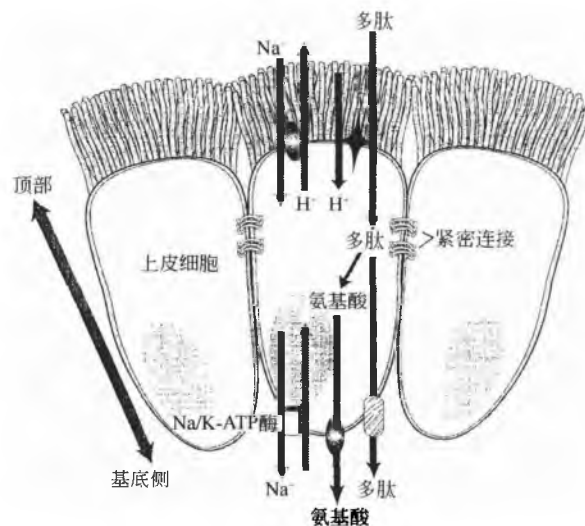


图9 多肽通过肠上皮细胞转运的模型

二肽的肠吸收具有立体化学专一性。L-L 构象二肽的转运比它们的 O-氨基酸异构体容易得多。L-L 构象二肽的吸收速率最高，其次是 L-D 和 D-L 异构体，然后是 D-D 异构体。

如上所述，肠对氨基酸、二肽和三肽的吸收机制特征明显。但是四肽和更大的肽吸收方面的文章有限，而且结果有些混乱。一般来说，四肽和更大的肽的胃肠道吸收不好。肽类和肽样药物 (相对分子质量 < 1500) 的口服生物利用度见表 2。

表 2 胃肠道对多肽和肽样药物的吸收

化合物	相对分子质量	吸收程度/%	文献
食用二肽和三肽	200~300	5~50	[30]
氨基头孢菌素	350	>50	[31]
依那普利	377	>50	[32]
食用四肽	≈400	≈5	[28]
TRH 类似物	≈400	≈5	[28]
酞氨西林	482	>50	[33]
脑啡肽	600	<2	[28]
甘氨酸抑肽素	740	<2	[28]
环生长抑素	806	<5	[34]
缓激肽	1060	<2	[28]
抗利尿激素	1200	<2	[28]
环孢霉素 A	1203	>50	[35]
醋酸亮丙瑞林	1208	<5	[36]

3. 多肽和蛋白质药物的吸收

肠膜的细胞上没有转运多肽和蛋白质的载体, 而且由

于多肽和蛋白质的分子较大, 不能通过紧密连接。并且多肽和蛋白质是腔内、刷状缘和溶细胞酶的底物。因此如表 3 所示, 肽类和蛋白质类药物在胃肠道中的吸收很差。

表 3 胃肠道对多肽和蛋白质类药物的吸收

化合物	相对分子质量	吸收程度/%	文献
β -脑啡肽	≈3500	<2	[28]
降钙素	≈3500	<2	[28]
促肾上腺皮质激素 (ACTH)	≈4700	<2	[28]
胰岛素	5700	0.5	[36]
生长激素	22 600	<2	[28]
辣根过氧化物酶 (HRP)	40 000	3	[37]
牛血清白蛋白 (BSA)	50 000	4.5	[38]

蛋白质以原型的吸收较差, 但有一个特例: 婴儿出生后的最初几天可以吸收原型蛋白质。新生哺乳动物的肠吸收细胞在功能和形态上专门适合于摄入和转运乳类大分子^[39]。新生儿肠腔蛋白水解酶的水平较低, 而且可以通过独特的内吞机制使完整的蛋白质吸附于上皮细胞表面并转运通过细胞膜。这种功能对新生儿来说非常重要, 它使新生儿吸收初乳中的免疫球蛋白而获得被动免疫。与人类和啮齿类动物不同, 牛、羊、马和猪等许多动物不能提供可以穿过胎盘的足够抗体, 并且幼仔出生时没有循环抗体。因此这些动物刚出生时, 主要甚至完全依靠内吞机制在小肠中摄入免疫球蛋白而获得被动免疫。但是小肠的高度内吞作用不能保护机体免受细菌蛋白和抗原的入侵。机体成熟以后, 小肠上皮迅速发生形态变化, 终止了小肠上皮的高度内吞作用, 而导致吸收原型蛋白质的能力降低。

尽管成人的肠上皮屏障比新生儿有效, 仍有证据表明少量的蛋白质以原型通过肠上皮细胞进行转运。这可能有两种机制: 内吞作用和经淋巴集结转运。

3.1 内吞作用

胃肠道的上皮细胞膜由连续的细胞屏障构成, 这一屏

障允许小分子通过简单扩散或者各种载体介导而转运。蛋白质等大分子则通过细胞小泡的液相内吞作用(胞饮)或者通过受体介导的内吞作用或胞转作用从肠腔吸收(图 6)。在胞饮作用中, 细胞外液被吞入上皮膜的小泡中。起初, 局部上皮细胞膜向内凹陷形成囊状结构。当囊深入细胞浆时, 形成了含有本来在细胞外的大分子的小泡。因此大部分通过小泡进入细胞内的大分子无法进一步进入组织和血液循环。更确切地说, 小泡使大分子往返于融合有溶酶体的内涵体中, 溶酶体的膜再反向循环为上皮细胞膜而且大分子降解。例如, HRP 在家兔的空肠中通过内吞作用被细胞摄取, 约 97% 的分子在通过溶酶体系统时被降解^[37]。胞饮作用对转运的底物无特异性。一些病毒和微生物可以通过胞饮作用进入细胞内, 但并不被溶酶体系统降解。一些寄生虫和微生物可以在溶酶体系统内生存, 而且其他生物也有进入细胞质的方法, 涉及的机制包括利用细胞膜表面的特定结构或者改变溶酶体的 pH 等。

与此相反, 受体介导的内吞作用具有专一性。嵌入膜中的蛋白质有专一的位点暴露在细胞外液中。受体蛋白质通常丛集于膜表面叫做有被小窝的区域, 有被小窝通过由

T

网格蛋白组成的绒毛层排列在胞质侧。配体与受体位点相结合后,被有被小窝的内芽运往胞内形成有被小泡,有被小泡脱去网格蛋白并融合形成内含体,配体和受体在内含体中分离,且受体返回细胞表面。内含体和溶酶体融合同时配体降解。

胞转作用是内含体携内容物穿过上皮细胞却不与溶酶体融合的过程(图6)。大多数内吞的蛋白质都被降解,这说明大多数内吞的蛋白质都要经过溶酶体途径,而胞转途径只是少数。经检测^[37],只有3%的HRP避免了与溶酶体融合而进入血液循环。但有趣的是,免疫球蛋白A(分子质量 $\approx 160\text{kDa}$)和免疫球蛋白M(分子质量 $\approx 970\text{kDa}$)是通过载体介导的内吞作用进入细胞的,并从细胞一侧转运至另一侧,而不与溶酶体结合。研究免疫球蛋白的胞转作用和上述不被溶酶体降解的微生物和寄生虫的内吞作用,看能否为肽类和蛋白质的转运所利用,这将是非常有趣的工作。

3.2 经上皮的淋巴集结转运

尽管胃肠道具有屏障功能,但黏膜仍是大多数病原体入侵的主要位点之一。淋巴滤泡的有机结构——淋巴集结可以保护这些易受攻击的膜表面。淋巴集结于1677年被Johanni Peyeri发现,它由位于肠外壁上的30~40个淋巴结组成^[40],在人体小肠的回肠段最为突出。其特征是有特殊的上皮细胞,即M细胞(微褶细胞或称膜状细胞)。M细胞的形态与其他吸收细胞区别较大。其顶侧肠腔表面有很多微褶、短微绒毛和低浓度与膜相结合的酶。M细胞有较稀疏的多糖-蛋白质复合物,几乎没有溶酶体。而且,M细胞的基底膜表面深度内陷,形成了充满成簇B细胞、T细胞和巨噬细胞的泡囊(图10)。正是由于M细胞这些独特的结构特征,大分子和微粒可以内吞并转运至淋巴系统。天然铁蛋白、HRP和凝集素等一些蛋白质通过胞饮作用摄取,并穿过M细胞从肠腔到细胞外。这与前文提到的免疫球蛋白A相反,免疫球蛋白A是通过受体介导的内吞作用而内化的。除大分子外,病毒和细菌也是通过淋巴集结进入机体的。HRP的浓度影响其从内腔到淋巴系统的转运过程。低浓度的HRP主要通过M细胞摄入,高浓度的则同时通过M细胞和吸收细胞转运^[39]。HRP以原型形式经由含淋巴集结的肠片断的转运要快于从邻近不含淋巴集结的片断的转运。HRP在含淋巴集结的片段中的表现渗透系数(P_{app})约是不含淋巴集结的片断的7倍^[41]。

改善肽类和蛋白质口服吸收的方法

如本章所述,由于肽类(>3 个氨基酸)和蛋白质易被胃肠道中的强酸和酶降解,而且肽类和蛋白质对胃肠道膜的通透性低,所以口服吸收较差。

利用各种处方可以保护肽类和蛋白质不被恶劣的胃肠道环境所降解,从而增强口服吸收,如采用微粒药物载体(微球、微粒和外源凝集素)、同时使用酶抑制剂和吸收促

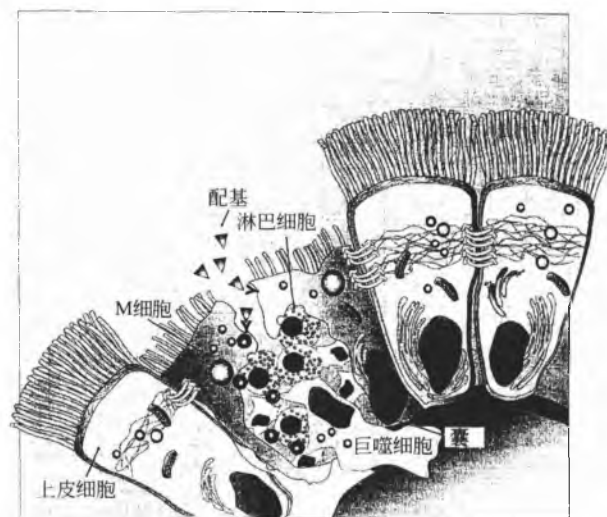


图10 M细胞示意图

进剂、进行化学修饰(前药)以及对结肠和直肠进行定位给药等。这些方法将在后文中予以讨论。

1. 类蛋白质微球

类蛋白质是在酸性环境中,氨基酸受热聚集而自发形成的微球^[42],直径为 $1\sim 5\mu\text{m}$ 。类蛋白质微球在 $1\sim 3$ 的低pH条件下较稳定,而在pH $6\sim 7$ 时不稳定。这样,类蛋白质微球就可以保护肽类和蛋白质在胃中不被酸和酶降解,而在小肠中释放包封的药物,使其吸收。类蛋白质也可以抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶等肽酶的活性。给糖尿病大鼠口服类蛋白质包裹的胰岛素,可以表现出明显的降血糖效应并且比皮下给药的持续时间长。服用类蛋白质包裹的降钙素的试验组大鼠,与服用安慰剂的对照组相比,血清中的钙浓度显著降低。这些结果均表明类蛋白质能增强肽类和蛋白质药物的口服吸收^[42]。

2. 脂质体

脂质体作为转运肽类和蛋白质的工具,受到了广泛关注。它可以保护不稳定的化合物不被降解,或者促进吸收较差的化合物的摄入。近年来脂质体被广泛应用于蛋白质口服的研究中,尤其是在胰岛素的给药方面。给糖尿病大鼠口服胰岛素脂质体可以明显地降低血糖水平^[43]。脂质体可以分为三类:多室脂质体(MLV),粒径 $0.05\sim 10\mu\text{m}$;小单室脂质体(SUV),粒径 $0.025\sim 0.05\mu\text{m}$;大单室脂质体(LUV),粒径 $0.2\sim 2\mu\text{m}$ (图11)。

脂质体是包含一定体积水溶液的脂质双分子层囊泡。脂质体可以由多种磷脂组成。最常用的脂类为卵磷脂。脂质体的外膜是半透膜,改变制备脂质体的脂质种类就可以改变其通透性。使用不饱和脂类,膜的流动性较好,脂质体的通透性较高。而使用磷脂和胆固醇的混合物制备脂质体,通透性较低。胆固醇可以压缩磷脂的组装,从而减小磷脂双分子层的通透性并且增强磷脂双分子层的稳定性。

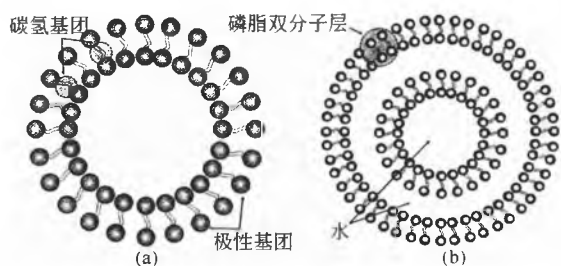


图 11 单层和多层脂质体。(a) 单层脂质体；(b) 多层脂质体

使用磷脂酰丝氨酸或磷脂酰肌醇可以制得带负电荷的脂质体，使用硬脂酰胺则制得带正电荷的脂质体。目前提出了三种脂质体透膜转运的机制^[44]：自由分子机制、自由分子和直接的脂质体/膜共同作用的机制、直接的脂质体/膜机制。自由分子机制适用于水溶性药物，药物分子首先从脂质体中扩散到体腔，然后进行自由分子的膜转运。自由分子和直接的脂质体/膜共同作用的机制是药物分子在体腔内引起的渗透和分子在脂质体和膜之间直接转运的总和。最后一个机制，即直接的脂质体/膜机制，适用于水不溶性药物，这一机制的前提是从脂质体至体腔的释放动力学可以忽略不计。

从 1970 年开始，大量报道详细地介绍了脂质体给药系统的优势。但是，这些系统在口服给药方面并不成功，可能是由于：①在胃肠道中不稳定；②对 pH 变化、胆酸盐和脂肪酶较敏感。另外，脂质体系统具有免疫原性。

3. 外源凝集素

外源凝集素特异性结合上皮细胞表面的性质，可以应用于肽类和蛋白质的口服给药系统中。将含有肽类或蛋白质药物的纳米粒用外源凝集素修饰，可以防止药物在小肠腔内的降解，并且作为专一的靶向配体，有利于肽类或蛋白质药物通过 M 细胞而摄入。

4. 联用酶抑制剂

要促进口服多肽和蛋白质类药物在胃肠道中的吸收，必须克服酶的屏障作用。多种蛋白酶/肽酶抑制剂被用于增强肽类和蛋白质药物的口服生物利用度。迄今为止，应用的抑制剂有抑肽酶、枯草菌肽、Bowman-Birk 抑制剂、甲磺卡莫司他、大豆胰蛋白酶抑制剂、甘氨酸钠和糜蛋白酶抑制剂 (FK-448) 等。其中一些抑制剂除能抑制酶的活性外，还能促进药物的吸收。例如说，胰岛素常常被用作研究酶抑制剂活性的蛋白质模型药物。胰蛋白酶抑制剂和抑肽酶在促进大鼠的胰岛素吸收方面具有边缘效应。然而口服胰岛素的同时服用甘氨酸钠、甲磺卡莫司他和枯草菌肽，可以观测到明显的降血糖作用^[45]，这可能因为这些化合物不仅是酶的抑制剂，而且还是吸收促进剂。尽管多种候选物在抑制酶的活性和促进药物吸收方面的功能已经确定，但还需要对这些化合物的人体长期安全性做进一步研究。

5. 联用吸收促进剂

受极性和分子大小的限制，大多数多肽和蛋白质药物的肠膜通透性较差。因而，同时服用吸收促进剂可以增强这类药物的通透性。目前用作肽类和蛋白质类药物口服吸收促进剂的有胆酸盐、非离子表面活性剂、阴离子表面活性剂、溶血卵磷脂、中长链甘油酯和水杨酸盐等。尽管其作用机理尚未完全阐明，但目前尤其在胰岛素的吸收方面，提出了一些可能的机制，包括如下几种：

(1) 某些促进剂，如胆酸盐，不仅能促进吸收，而且能抑制酶的活性；

(2) 促进剂有分散剂的作用，可以阻止肽类和蛋白质分子在溶液中聚合，从而增加药物的溶解度；

(3) 促进剂能够降低黏膜层的黏性并增加膜的流动性，因而开放细胞膜上的水通道从而促进吸收；

(4) 带正电荷的促进剂与带负电荷的上皮细胞膜相互作用，中和膜表面电荷，从而增加蛋白质的吸收。

大部分促进剂对膜有刺激作用，且它们的长期毒性尚未清楚，有待阐明^[46]。

6. 化学修饰

大多数天然肽类和蛋白质在胃肠道中的吸收较差，因为它们亲水性化合物，分配系数（辛醇和水分配系数的对数， $\log P$ ）较低，数量级为 -1。例如，TRH 和血管加压素的 $\log P$ 值分别为 -1.43 和 -2.15。也有一些例外，如环孢菌素。环孢菌素是亲脂性肽类 ($\log P=3.0$)，而且表面几乎没有极性基团。药物化学专家运用三种常规的化学修饰方法来改善肽类和蛋白质药物的口服吸收，即类似物、不可逆的衍生物和前药。当化合物是由于在体内代谢而吸收较差时，通常应用不可逆衍生物和类似物的方法。肽类药物，如脑啡肽、TRH、血管加压素和胰岛素等实例可以作为蛋白质药物的模型。运用不可逆的衍生物和类似物的方法进行化学修饰可以保护肽类或蛋白质不被水解，但也可能会导致药物生物活性的降低。如糜蛋白酶，由胰腺分泌到肠腔的主要肽酶之一，可以在短时间内裂解胰岛素分子内的五个键，而这五个残基中的四个残基在维持胰岛素生物活性方面起着很重要的作用，并且对其与受体结合的能力来说也是必要的^[47]。在胰岛素分子内的这些位点进行的多种化学修饰都可以增强化学稳定性，但这类变化可能会改变蛋白质的三维结构，从而导致活性的降低。

在改善肽类的吸收方面，前药是使用最为广泛的化学修饰方法。前药方法的特性在于它可以优化药物在脂溶性和降解方面的物理化学性质而不改变母体药物内在的生物活性。前药本身无活性。然而肽的前药一旦被吸收，便转化为有活性的肽（通常是在酶的作用下）。ACE（乙酰胆碱酯酶）抑制剂——依那普利便是一个很好的例子，它口服吸收很好并可在肝脏中代谢为它的活性形式，即 enalaprilat。而母体药物 enalaprilat 的口服吸收非常差。

T

7. 结肠给药

结肠作为肽类和蛋白质药物的给药部位非常引人注目。因为结肠的酶活性尤其是肽酶的活性比小肠低得多,而且药物在结肠的停留时间比在小肠长。但是肽类和蛋白质的结肠定位给药存在以下一些缺点:

(1) 结肠黏膜没有小肠的绒毛和微绒毛,因此结肠的吸收表面积要远远小于小肠。

(2) 结肠中的肽酶,如氨肽酶和二氨肽酶的浓度比小肠低。然而研究表明结肠中脯氨酰内切蛋白酶和胶原酶的活性是小肠的5~6倍。TRH在结肠中比在小肠和直肠中更易水解为脱氨基TRH。因此为脯氨酰内切蛋白酶和胶原酶底物的肽类易在结肠中降解,不适合结肠给药。

(3) 结肠中的细菌(主要是厌氧菌)浓度比小肠中高得多。高浓度的细菌加快了一些药物的降解,比如地高辛在结肠的微生物群作用下降解为二氢地高辛。

利用微生物降解机制,可能实现肽类和蛋白质药物的结肠定位给药。将肽类和蛋白质药物用芳香偶氮基团包衣,形成不透层,可以保护药物不在胃和小肠中消化。当聚合物包衣的肽类和蛋白质药物到达结肠后,结肠细菌切断偶氮键并破坏多聚物膜,药物释放至结肠而吸收。大鼠实验表明,这类高分子系统可以保护和转运口服的胰岛素和血管加压素^[7]。

8. 直肠给药

由于胃肠道的降解作用和较低的透膜吸收能力,多肽和蛋白质药物的口服通常受到一定的限制。而直肠给药与口服相比具有一些优势,如酶的活性较低、pH为中性、并且可以部分绕过首过效应。长期以来,直肠一直作为脂溶性小分子的特定吸收部位,而亲水性大分子的直肠转运仍存在问题,因为这类药物吸收较差,可能需要吸收促进剂。研究表明,去脑啡肽- γ -内啡肽、去甘氨酸精氨酸加压素、白蛋白和生长抑素类似物与促进剂同时给药时,肽类的吸收增强。胰岛素的直肠给药促进剂有表面活性剂、胆酸、EDTA和磷脂(如卵磷脂、皂苷类、水杨酸钠、有机醇、酸、酰胺和脂类等)。其作用机制尚无定论。一些可能的机制已在前文的“联用酶抑制剂”中做了说明。

结论

随着生物技术的迅速发展,生产出了大量高纯、高效且高度专一的肽类和蛋白质类药物。尽管口服给药患者更易于接受,但目前仍以注射为主。与注射途径相比,口服有许多优势,如给药方便、患者的耐受性增强等。然而总的来说,肽类和蛋白质类药物的口服非常困难,因为它们相对分子量大、亲水性强,并且是胃肠道的肽酶和蛋白酶的底物。肽类和蛋白质药物口服后,在多个位点可能会被水解。胃中的强酸环境导致其部分降解。进入小肠腔后,在胰腺分泌的肽酶的作用下,进一步降解,然后刷状缘和

上皮细胞内部的酶也会降解肽类和蛋白质。即使一些肽类和蛋白质能够幸免并进入细胞内,但当它们扩散进入细胞后,又被溶酶体摄取,大部分肽类和蛋白质药物会被溶酶体中的酶水解。最后那些通过上皮细胞进入门静脉的肽类和蛋白质药物仍然会被肝代谢。另外由于受到分子大小和极性的限制,它们对肠膜的通透性往往较差。

要减少肽类和蛋白质类药物的降解,改善其口服吸收,以下几个因素非常重要:

首先,必须保护肽类和蛋白质药物不被胃中的酸性环境降解,不被小肠腔和刷状缘上的酶降解。这可以通过联用肽酶抑制剂或者进行化学修饰来实现,例如,使用类似物或前药的方法,或者使用微球、脂质体等处方。

其次,因为肽类和蛋白质分子较大,并具有亲水性,所以透肠膜的吸收很差,需要改善。可以通过联用渗透促进剂或者进行化学修饰(如增加脂溶性)等方法来实现。

最后,上述所有方法也许都是可行的,但仍然面临一个主要的障碍,即如何使肽类和蛋白质以原型通过上皮细胞,同时不被溶酶体摄取并且避免肝的首过效应。最好的避免溶酶体摄取及肝首过效应的方法是通过淋巴集结的M细胞进行扩散,M细胞不含溶酶体,并且可以直接将扩散物质运送至淋巴系统。研究抗原或微粒透过肠壁的胞转机制,并应用于肽类和蛋白质的转运,也许能解决这个问题。

总之,尽管口服是肽类和蛋白质药物转运中较受欢迎的给药途径,但如上所述,仍有许多不足。肽类和蛋白质口服给药的成功仍然是一项艰巨的挑战。

参考文献

1. Kutchai, H. C. The Gastrointestinal System. Physiology, 4th Ed.; Berne, R. M., Levy, M. N., Eds.; Mosby: St. Louis, MO, 1998.
2. Egberts, H. J.; Koninkx, J. F.; Dijk, J.; Mouwen, J. M. Biological and Pathobiological Aspects of the Glycocalyx of the Small Intestinal Epithelium. A review. Vet. Q. 1984, 6 (4), 186—199.
3. Russell-Jones, G. J.; Aizpurua, H. J. Vitamin B₁₂: A Novel Carrier for Orally Presented Antigens. Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, 1988; 15, 142—143.
4. Park, J. Y. Biophysical Model Approach to the Mechanistic Studies of Intestinal Absorption of Drugs. The University of Michigan; Ann Arbor, 1977; Thesis.
5. Sallee, Y. L.; Wilson, F. A.; Dietschy, J. M. Determination of Unidirectional Uptake Rates for Lipids Across the Intestinal Brush Border. J. Lipid Res. 1972, 13 (2), 184—192.
6. Ugolov, A. M. Physiology and Pathology of Membrane Digestion. Plenum Press; New York, 1968.
7. Saffran, M.; Kumar, G. S.; Savariar, C.; Burnham, J. C.; Williams, F.; Neckers, D. C. A New Approach to



- the Oral Administration of Insulin and Other Peptide Drugs. Science 1986, 233 (4768), 1081–1084.
8. McNally, E. J. Protein Formulation and Delivery. Drugs and the Pharmaceutical Sciences; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 99.
 9. Campbell, N. A. Structure and Function of Macromolecules. Biology, 2nd Ed.; The Benjamin/Cummings Publishing Co.: Redwood City, CA, 1990.
 10. Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. Amino Acid Oxidation and the Production of Urea. Principle of Biochemistry, 2nd Ed.; Worth Publishers: New York, 1993; 510.
 11. Adibi, S. A.; Moore, E. L. The Number of Glycine Residues Which Limit Intact Absorption of Glycine Oligopeptides in Human Jejunum. J. Clin. Invest. 1977, 60 (5), 1008–1016.
 12. Tsukita, S.; Furuse, M. Pores in the Wall: Claudins Constitute Tight Junction Strands Containing Aqueous Pores. J. Cell. Biol. 2000, 149 (1), 13–16.
 13. Ho, N. F. H.; Higuchi, W. I.; Turi, J. Theoretical Model Studies of Drug Absorption and Transport in the GI Tract III. J. Pharm. Sci. 1972, 61 (2), 192–197.
 14. Ho, N. F. H.; Higuchi, W. I. Theoretical Model Studies of Intestinal Drug Absorption. IV. Bile Acid Transport at Premicellar Concentrations Across Diffusion Layer—Membrane Barrier. J. Pharm. Sci. 1974, 63 (5), 686–690.
 15. Ho, N. F. H.; Park, J. Y.; Morozowich, W.; Higuchi, W. I. Physical Model Approach to the Design of Drugs with Improved Intestinal Absorption. Design of Biopharmaceutical Properties Through Prodrugs and Analogs; Roche, E. B., Ed.; American Pharmaceutical Association: Washington, DC, 1977; 136–227.
 16. Augustijns, P. F.; Bradshaw, T. P.; Gan, L.-S. L.; Hendren, R. W.; Thakker, D. R. Evidence for a Polarized Efflux System in Caco-2 Cells Capable of Modulating Cyclosporin a Transport. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993, 197 (2), 360–365.
 17. Burton, P. S.; Conradi, R. A.; Hilgers, A. R.; Ho, N. F. H. Evidence for a Polarized Efflux System for Peptides in the Apical Membrane of Caco-2 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993, 190 (3), 760–766.
 18. Anderson, J. M.; van Itallie, C. M. Tight Junctions and the Molecular Basis for Regulation of Paracellular Permeability. Am. J. Physiol. 1995, 269 (32), G467–G475.
 19. Daugherty, A. L.; Morsny, R. J. Regulation of the Intestinal Epithelial Paracellular Barrier. Pharmaceutical Science & Technology Today 1999, 2 (7), 281–287.
 20. Lutz, K. L.; Siahaan, T. J. Molecular Structure of the Apical Junction Complex and Its Contribution to the Paracellular Barrier. J. Pharm. Sci. 1997, 86 (9), 977–984.
 21. Knipp, G. T.; Ho, N. F.; Barsuhn, C. L.; Borchardt, R. T. Paracellular Diffusion in Caco-2 Cell Monolayers; Effect of Perturbation on the Transport of Hydrophilic Compounds that Vary in Charge and Size. J. Pharm. Sci. 1997, 86 (10), 1105–1110.
 22. Adson, A.; Raub, T. J.; Burton, P. S.; Barsuhn, C. L.; Hilgers, A. R.; Audus, K. L.; Ho, N. F. H. Quantitative Approaches to Delineate Paracellular Diffusion in Cultured Epithelial Cell Monolayers. J. Pharm. Sci. 1994, 83 (11), 1529–1536.
 23. Lukie, B. E.; Westergaard, H.; Dietschy, J. M. Validation of a Chamber that Allows Measurement of Both Tissue Uptake Rates and Unstirred Layer Thicknesses in the Intestine Under Conditions of Controlled Stirring. Gastroenterology 1974, 67 (4), 652–661.
 24. Osiecka, I.; Porter, P. A.; Borchardt, R. T.; Fix, J. A.; Gardner, C. R. In Vitro Drug Absorption Models. I. Brush Border Membrane Vesicles, Isolated Mucosal Cells and Everted Intestinal Rings; Characterization and Salicylate Accumulation. Pharm. Res. 1985, 2 (6), 284–292.
 25. Kakemi, K.; Arita, T.; Muranishi, S. Absorption and Excretion of Drugs. XXV. On the Mechanism of Rectal Absorption of Sulfonamides. Chem. Pharm. Bull. 1965, 13 (7), 861–869.
 26. Ho, N. F. H.; Park, J. Y.; Ni, P.; Higuchi, W. I. Advancing Quantitative and Mechanistic Approaches in Interfacing Gastrointestinal Drug Absorption Studies in Animals and Humans. Animal Models for Oral Drug Delivery in Man; In Situ and In Vivo Approaches; Crouthamel, W., Sarapu, A. C., Eds.; American Pharmaceutical Association: Washington, DC, 1983; 27–106.
 27. Schedl, H. P.; Clifton, J. A. Cortisol Absorption in Man. Gastroenterology 1963, 44 (2), 134–145.
 28. TenHoor, C. N.; Dressman, J. B. Oral Absorption of Peptides and Proteins. Sciences Technologies Pratiques Pharma. Sci. 1992, 2 (4), 301–312.
 29. Liang, R.; Fei, Y.-J.; Prasad, P. D.; Ramamoorthy, S.; Han, H.; Yang-Feng, T. L.; Hediger, M. A.; Ganapathy, V.; Leibach, F. H. Human Intestinal H⁺/Peptide Cotransporter. Cloning, Functional Expression, and Chromosomal Localization. J. Biol. Chem. 1995, 270 (12), 6456–6463.
 30. Nightingale, C. H.; Greene, D. S.; Quintiliani, R. Pharmacokinetics and Clinical Use of Cephalosporin An-

T

- tibiotics. *J. Pharm. Sci.* 1975, 64 (12), 1899—1927.
31. Ganapathy, V.; Leibach, F. H. Is Intestinal Peptide Transport Energized by a Proton Gradient. *Am. J. Physiol.* 1985, 249 (12), G153—G160.
32. Yokohama, S.; Yamashita, K.; Toguchi, H.; Takeuchi, J.; Kitamori, N. Absorption of Thyrotropin-Releasing Hormone After Oral Administration of TRH Tartrate Monohydrate in the Rat, Dog and Human. *J. Pharm. Dyn.* 1984, 7 (2), 101—111.
33. Bell, J.; Peters, G. E.; McMartin, C.; Thomas, N. W.; Wilson, C. G. Estimation of Gut Absorption of Peptides by Biliary Sampling. *J. Pharm. Pharmacol.* 1984, 36 (Suppl.), 88.
34. Wood, A. J.; Lemaire, M. Pharmacologic Aspects of Cyclosporine Therapy: pharmacokinetics. *Transplant. Proc.* 1985, 17 (4 Suppl 1), 27—32, Review.
35. Okada, H.; Yamazaki, I.; Ogawa, Y.; Hirai, S.; Yashiki, T.; Mima, H. Vaginal Absorption of a Potent Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Analog (Leuprolide) in Rats I: Absorption by Various Routes and Absorption Enhancement. *J. Pharm. Sci.* 1982, 71 (12), 1367—1371.
36. Crane, C. W.; Luntz, G. R. Absorption of Insulin from the Human Small Intestine. *Diabetes* 1968, 17 (10), 625—627.
37. Heyman, M.; Ducroc, R.; Desjeux, J. F.; Morgat, J. L. Horseradish Peroxidase Transport Across Adult Rabbit Jejunum in Vitro. *Am. J. Physiol.* 1982, 242 (5), G558—G564.
38. Kimm, M. H.; Curtis, G. H.; Hardin, J. A.; Gall, D. G. Transport of Bovine Serum Albumin Across Rat Jejunum: Role of Enteric Nervous System. *Am. J. Physiol.* 1994, 266 (29), G186—G193.
39. Gornellia, P. A.; Walker, W. A. Macromolecular Absorption in the Gastrointestinal Tract. *Adv. Drug Del. Rev.* 1987, 1, 235—248.
40. Kubly, J. *Immunology*, 2nd Ed.; Feeman, W. H., Ed.; W. H. and Company: New York, 1994; 76—77.
41. Ho, N. F. H.; Day, J. S.; Barsuhn, C. L.; Raub, T. J. Biophysical Model Approaches to Mechanistic Trans epithelial Studies of Peptides. *J. Controlled Rel.* 1990, 11, 3—24.
42. Steiner, S.; Rosen, R. Delivery Systems for Pharmacological Agents Encapsulated with Proteinoids. US. Patent 4925673, 1990.
43. Patel, H. M.; Ryman, B. E. Oral Administration of Insulin by Encapsulation Within Liposomes. *FEBS Lett.* 1976, 62 (1), 60—63.
44. Ganesan, M. G.; Weiner, N. D.; Flynn, G. L.; Ho, N. F. H. Influence of Liposomal Drug Entrapment on Percutaneous Absorption. *Int. J. Pharm.* 1984, 20, 139—154.
45. Bernkop-Schnürch, A.; Marschütz, M. K. Development and In Vitro Evaluation of Systems to Protect Peptide Drugs from Aminopeptidase. *N. Pharm. Res.* 1997, 14 (2), 181—185.
46. Zhou, X. H. Overcoming Enzymatic and Absorption Barriers to Non-Parenterally Administered Protein and Peptide Drugs. *J. Controlled Rel.* 1994, 29, 239—252.
47. Pullen, R. A.; Lindsay, D. G.; Wood, S. P.; Tickle, I. J.; Blundell, T. L.; Wormer, A.; Krail, G.; Brandenburg, D.; Zahn, H.; Glieman, J.; Gammeltoft, S. Receptor-Binding Region of Insulin. *Nature* 1976, 259 (5542), 369—373.

进一步阅读

- Amidon, G. L.; Wolfgang, S. Membrane Transporters as Drug Targets. *Pharmaceutical Biotechnology*; Kluwer/Plenum Publishers: New York, 1999; 12.
- Bai, J. P. F.; Chang, L. -L.; Guo, J. -H. Targeting of Peptide and Protein Drugs to Specific Sites in the Oral Route. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1995, 12 (4), 339—371.
- Davis, S. S.; Illum, L.; Tomlinson, E. NATO ASI Series. Series A: Life Sciences. *Delivery Systems for Peptide Drugs*; Plenum Press: New York, 1986; 125.
- Lee, V. H. L. Peptide and Protein Drug Delivery. *Advances in Parenteral Sciences*; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1991; 4.
- Woodley, J. F. Enzymatic Barriers for GI Peptide and Protein Delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1994, 11 (2, 3), 61—95.

(陈芳译)

肽类和蛋白质类药物的口腔黏膜吸收

Ashim K. Mitra

Hemant H. Alur

Thomas P. Johnston

University of Missouri-Kansas City, Kansas City, Missouri, U. S. A.

T

引言

1. 背景和基本原理

近年来,随着蛋白质和肽类药物的发展和应用,为生物技术药物选择合适的给药途径和处方是药剂学专家面临的挑战。蛋白质和肽类药物最常见的给药途径是注射。注射易导致疼痛,患者耐受性较差,并且需要消毒。胃肠道给药容易被酸水解,而且存在肠或肝的首过效应,因此口服生物利用度较低。另外可供选择的非注射途径是黏膜和经皮给药。经皮给药只限于强效和脂溶性化合物,血液浓度上升缓慢,并且与口腔黏膜给药相比渗透性较差^[1]。在蛋白质的全身转运方面研究了多种不同的吸收黏膜,包括鼻黏膜、眼部黏膜、肺黏膜、直肠黏膜、阴道黏膜、口腔黏膜和舌下黏膜。一些相关的缺点限制了鼻部、眼部、肺部、直肠和阴道黏膜给药的广泛使用,而口腔和舌下黏膜给药的限制较少,在蛋白质的全身转运方面非常引人注目。本章只介绍口腔黏膜给药。

2. 优点

口腔黏膜血管丰富,通过口腔黏膜给药可以直接进入全身循环,避免首过效应,而且不和胃肠道分泌的消化液接触。

口腔黏膜酶的活性较低,与鼻腔和直肠给药相比,药物由于生物化学降解而导致的失活要缓慢而且少得多^[2]。

口腔黏膜给药方便,无痛,能够准确定位,并且易于移去。口腔由左右一对口腔黏膜组成,给药系统可以用于一侧黏膜的不同部位,也可以用于左侧或右侧的不同位置。因此,适用于轻微或可逆性损伤、刺激黏膜的递药系统。

口腔黏膜给药可以应用于口腔黏膜的特殊区域,而且可以设计成单向释放系统,保护药物不受口腔局部环境的影响。在处方中还可以加入渗透促进剂、蛋白酶抑制剂或者 pH 调节剂来调节特殊的作用部位或其附近的膜环境或药片-膜环境。尽管促进剂、抑制剂和调节剂对局部区域有一定刺激,但可以减小全身毒性。而且口腔黏膜不易遭受不可逆损伤,适合这种类型的调节^[3]。万一发生毒副作用,可以迅速移除药物,终止给药。

另外,口腔黏膜给药非常适用于口服吸收不好的患者,比如失去意识的患者、刚做过手术的患者以及胃肠道疾病患者。

3. 不足

口腔黏膜的吸收表面积远远小于胃肠道、鼻部、直肠和阴道黏膜。口腔黏膜持续被唾液冲洗,并且分泌的唾液降低了吸收黏膜处的药物浓度。这两个因素和药物的通透系数一起影响了口腔黏膜给药的总吸收速率。而且,口腔黏膜比上述的任何一种黏膜的通透性都差。

无意识地吞咽溶解药物的唾液和吞咽给药系统,都会造成吸收部位药物的减少;讲话、吃东西、喝水影响递药系统的保留^[1];另外在取出给药装置时有造成窒息的危险。

口腔黏膜给药系统还受药物的味道、刺激性和过敏性的限制。

口腔黏膜的解剖与生理

1. 结构

口腔黏膜在解剖学上分为三层(图1)^[4]。这三层分别是上皮、基底膜和结缔组织。

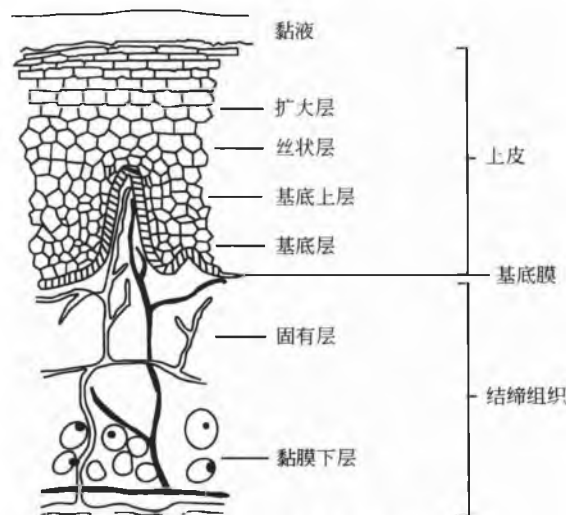


图1 口腔黏膜的主要组成示意图^[4]

1.1 上皮

上皮由40~50层的复层鳞状上皮细胞组成。上皮细胞起源于基底膜的立方细胞,经过持续的有丝分裂迁移到

T

表面。当细胞通过中间层到达表面时,开始分化、变大、变平,并被一层外部的脂质基质(膜包裹颗粒)所包围。这种外部脂质基质决定了药物对组织的渗透性。尽管牙龈和硬腭已经角质化,但口腔、舌下和软腭区未角质化。人和家兔口腔上皮的厚度随位置的不同而不同,达500~800 μm 。细胞更新周期为5~6天^[5]。另外口腔上皮的特点是存在细胞间间隙连接。

1.2 基底膜

基底膜(BM)是由细胞外物质组成的连续层,它构成了上皮层与结缔组织(固有层和黏膜下层)的界限。基底膜可以分为三部分:透明板、致密板和皮下纤维。基底膜的功能包括提供:①上皮组织和结缔组织的黏结;②上皮层的机械支持;③细胞和一些大分子通过的屏障。

1.3 结缔组织

结缔组织由固有层和黏膜下层构成。固有层是结缔组织的连续层,富含毛细血管和神经纤维。

来自口腔黏膜的血管主要经由舌部、面部和下颌后静脉,通向颈内静脉,从而避免了首过效应。

猴子、猿、狗、猪和家兔口腔黏膜的生理学特性都与人类相似^[5]。

2. 通透性

2.1 通透屏障

口腔黏膜的通透性介于皮肤表皮和肠黏膜之间。

上皮: 上皮的外三分之一部分是药物扩散的主要屏障,对于角质化和未角质化的上皮均是如此。因此角质化不可能是口腔黏膜通透的主要障碍。

膜包裹颗粒(MCG): MCG是圆形或卵圆形的细胞器(直径为100~300nm),存在于角质化和未角质化上皮中,但在两种上皮中组成不同。MCG在细胞间隙释放内容物从而构成通透屏障。

渗透因素: 药物分子透过口腔黏膜进行渗透取决于以下因素:

(1) 分子大小。对于亲水性物质来说,当相对分子质量和分子大小(半径)增大时,渗透能力降低。分子质量小($M_w < 100\text{Da}$)的分子能迅速穿过口腔黏膜。

(2) 脂溶性。对于非离子型化合物,脂溶性增强,药物的渗透性明显增强。为了使吸收速度最大化,药物应该在唾液层中形成饱和溶液。

(3) 离子化。对于离子型化合物,在离子化程度最小的pH时,即药物主要以非离子形式存在时,渗透性最大^[6,7]。

通过跨细胞途径转运的药物的吸收具有pH依赖性,是因为离子型药物的膜-水分配系数取决于pH。

基底膜: 结缔组织的乳头状突起使得基底膜的表面积比上皮层大得多,从而影响有效的扩散路径长度。

3. 药物的转运机制

药物透过口腔黏膜转运遵循Fick扩散定律^[8,9]。被动扩散服从pH分配理论。文献中也有关于口腔黏膜存在载体介导转运的报道^[10,11]。药物扩散方程如式(1)所示:

$$J = \frac{DK_P}{h} \Delta C_e \quad (1)$$

式中: J 为药物扩散通量; D 为扩散系数; K_P 为分配系数; ΔC_e 为浓度梯度; h 为扩散路径长度。由式(1)可以看出: 增加膜的流动性,增大上皮附近的唾液中药物的溶解度,或者通过前药修饰增强药物的脂溶性,可以降低膜扩散的阻力,进而增大扩散通量。由于口腔黏膜致密的屏障性能,所以限速步骤是药物分子跨越上皮的移动。

透口腔黏膜转运有两条途径: ①跨细胞转运,即药物跨过黏膜上的单个细胞转运; ②细胞旁路,即药物通过黏膜细胞间连接转运。口腔黏膜的渗透系数从 1×10^{-5} 到 2×10^{-9} 不等^[12]。可以通过以下方法研究药物跨膜转运的途径: ①荧光显微技术^[12]; ②放射自显影^[5]; ③共聚焦激光扫描显微技术^[13]。

影响口腔黏膜全身给药的因素

1. 膜因素

通透性和厚度的局部差异影响了药物到达全身循环的速度和程度^[14]。各种口腔黏膜的角质化和成分尽管不是主要因素,也影响着黏膜给药的全身转运。另外,吸收膜的厚度、血液供应、血管/淋巴、细胞更新速度和酶的含量也控制着药物进入体循环的吸收。

2. 环境因素

2.1 唾液

唾液的主要成分是水(99%),pH随流动速率和位置的不同,为6.5~7.5^[15]。唾液的流动速率增加,则分泌增多,从而影响膜的厚度并促使受试药物在口腔中的移动。唾液的pH也很重要,因为非离子药物主要通过被动扩散机制口服吸收^[16,17]。

2.2 唾液腺

由于导管上或唾液管的附近,给药系统不易保持、药物容易被冲洗掉,或者给药系统迅速溶蚀,而难以达到高的局部药物浓度,所以一般不给药于导管上或唾液管的附近。而且如果将给药系统应用于唾液管上,唾液流速下降,导致不产生或者产生很少的黏液,就需要使用合适的生物黏附性给药装置。

2.3 口腔组织的运动

讲话、吃东西、吞咽都将导致嘴部运动,从而引起给



药装置的移除^[1]。由于舌头不断撞击药物制剂及其附近组织,而且舌头对硬腭的挤压产生了吸压,所以舌部运动也影响药物从黏膜黏附系统中的释放。

3. 剂型设计的考虑因素

3.1 概述

黏膜黏附口腔黏膜给药系统应该:

- (1) 给药方便、舒适;
- (2) 不含苦味药物;
- (3) 表面光滑;
- (4) 最好单向释药;

(5) 赋形剂(稀释剂和生物黏附性聚合物)无毒、不刺激唾液分泌且不刺激和损伤黏膜。

给药系统的大小由于处方类型的不同而不同,口腔黏膜片直径为5~8mm,柔软的口腔贴片面积可达10~15cm²。表面积1~3cm²的黏膜黏附口腔贴片最容易被接受^[18]。据估计,2cm²的给药系统一天之内跨口腔黏膜转运的药物总量为10~20mg^[12]。口腔黏膜给药系统的形状也可以千变万化,但椭圆形最为合适^[18]。给药装置的厚度往往只限于几毫米。给药装置的用药部位也是一个需要考虑的问题。黏膜黏附系统倾向于使用传统剂型,考虑到给药的灵活性和可供使用的口腔黏膜的面积,生物黏附口腔贴片是最合适的剂型。由于摄入食物和液体需要移除给药装置,所以口腔黏膜给药的最大保留和吸收时间为4~6h。

生物黏附性

生物黏附性是天然或合成材料长时间地黏附生物组织的能力^[18]。生物黏附现象可以分为两个步骤:第一步是聚合物和生物组织的初始接触;第二步是非共价作用引起的次级键的形成。

1. 生物膜的性质

口腔黏膜表面被黏液覆盖,黏液连接黏性物和膜。黏蛋白在中性和微酸性条件下是一种高分子电解质,末端唾液酸残基的pK_a值为2.6^[19]。在pH 7.4的生理环境下,黏蛋白分子带多个负电荷从而引起生物黏附。

2. 黏附性

许多聚合物被应用于生物黏附系统,包括水溶性和水不溶性、离子型和非离子型的水状胶体以及水不溶性水凝胶^[20]。影响聚合物生物黏附性质的因素包括以下几个方面:

2.1 聚合物的相对分子质量和构象

总的来说,当相对分子质量大于100 000时,聚合物的黏附强度增大^[21]。分子必须有足够的长度才能渗入黏液层中。聚合物分子的构象也起着同样重要的作用^[22]。

2.2 聚合物的交联度

交联度的增大引起了聚合物的扩散系数^[23]和链片断柔韧性和运动能力的降低,从而减少了相互渗透,降低了黏膜吸附强度。

2.3 聚合物的电荷和离子化

在黏附性和毒性两个方面,带负电荷的聚合物比带正电和不带电荷的聚合物更有利^[24]。带羧基的聚合物黏附性要好于带硫酸基团的聚合物^[25]。

2.4 聚合物的浓度

一般来说,聚合物的浓度越大,生物黏附性越小。卷曲分子在高浓度的溶液中溶解度较小,这样就减小了渗透入黏液层的链长度。因此为了得到最适宜的生物黏附性能,需要找到聚合物的临界浓度^[26]。

2.5 介质的pH

pH影响黏液和聚合物表面的电荷情况^[27]。由于在碳水化合物和氨基酸部分官能团的解离度不同,所以黏液表面的电荷密度随pH不同而改变。

2.6 聚合物的水合作用

尽管膨胀程度的增大不一定会引起生物吸附强度的增大,但是膨胀会影响生物黏附作用^[28]。水化黏膜黏附剂暴露以次级键形式的生物黏附位点,凝胶膨胀产生足够大的孔道,以及使所有柔软的聚合物链具有流动性以相互渗透都需要高度水活性。最佳的生物黏附要求黏膜黏附聚合物有一定的水合作用^[29]。但是过多的水合作用会影响形成光滑黏液,从而降低黏附强度。

3. 生物黏附理论

一般来说,黏膜黏附主要是通过物理键和弱化学键。物理键/机械键的形成是由于聚合物和黏蛋白链的缠结。当相互扩散时,生物黏附强度最大。

黏附键可以是共价键,或者静电力、氢键或疏水键等次级键。静电力或氢键主要由羟基(—OH)、羧基(—COOH)、磺酸基(—SO₃H)和氨基(—NH₂)引起。目前提出的生物黏附理论有浸润、扩散、电子、断裂和吸附理论,对生物黏附机制最好的解释是浸润、扩散和电子理论的结合。

4. 生物黏附力的测定方法

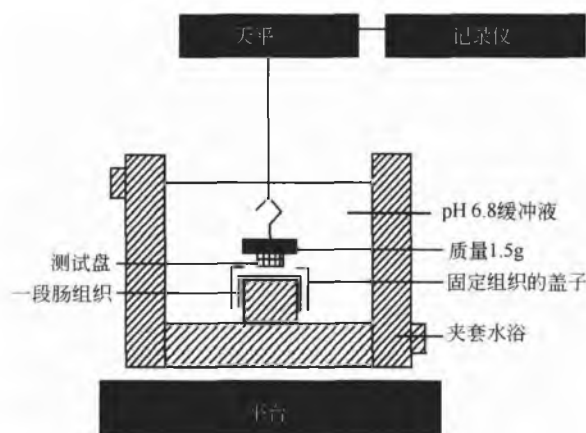
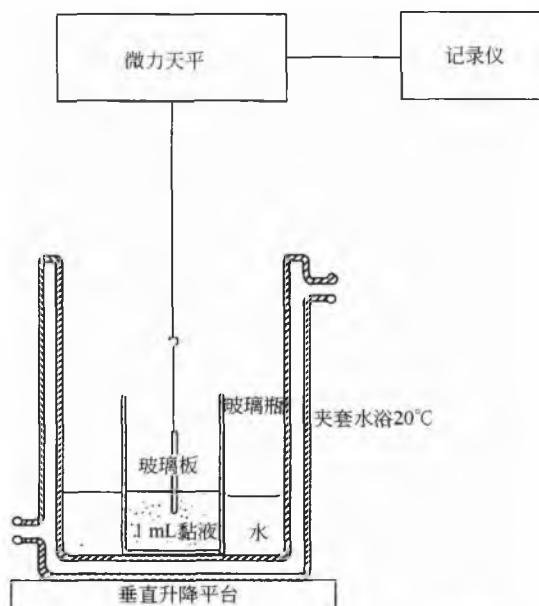
生物黏附力的测定不仅有助于筛选聚合物,而且有助于研究生物黏附机理。对包含聚合物和药物的最终剂型的性能测试是对生物黏附性的最好测试。

4.1 体外测定方法

体外测定生物黏附力的最广泛方法是对抗张力或者剪

T

切力的测量。所有体外测定的方法都对备选的一系列聚合物的生物黏附强度进行了等级划分。测定抗张强度是测定打破被测聚合物和模型膜之间的吸附键所需的力。这种方法往往需要调节天平或张力仪。将新鲜切除的家兔胃部组织片断放置在已称量过的玻璃瓶上,黏膜层向外,放入装有 USP-模拟胃液的烧杯中。另一段同样的组织放置在橡皮塞上,黏膜层向外(图 2)。少量的受试聚合物放入两个黏膜组织之间,记录将聚合物从组织剥离所需要的力^[29]。测定剪切力是测量聚合物沿平行于聚合物和黏膜的接触面的方向上滑行所需要的力。将覆有受试聚合物的玻璃板悬挂在微量天平上(图 3),然后将板浸入温度恒定的黏液样品中,在恒定的实验条件下测定将板从黏液样品中拉出所需的力^[22]。

图 2 测定张力的仪器和装置示意图^[93]图 3 测定剪切力的仪器和装置示意图^[22]

其余体外测定方法还有吸附质量法^[30]、荧光探针法^[24]、流动槽法(flow channel)^[31]、机械分光镜法(mechanical

spectroscopic)^[32]、降膜法(falling film)^[33]、金溶胶斑点法^[34]、黏度计法^[35]、拇指测试法(thumb test)^[36]、黏合数法(adhesion number)^[36]和电导率法^[36]等。

4.2 体内测定方法

生物黏附力的体内测定方法是测定黏附物在使用部位的停留时间^[36],方法相对较少,有 γ 射线闪烁扫描法、肠循环灌流法以及使用⁵⁵Cr 标记的生物黏附聚合物^[37]和^{99m}Tc 标记的聚卡波菲^[38]的放射性标记法。

口腔黏膜给药系统中的生物黏附性聚合物

许多水溶性和水不溶性的合成和天然聚合物^[20]都被用作生物黏附剂。

生物黏附性聚合物主要用于克服药物停留时间过短、增强药物剂型的局部定位能力,以及实现药物的缓释或控释。它分为三大类:①“湿”黏附剂,即发生水合作用后变黏;②本身带电荷,黏附无特异性,且为非共价键结合;③可以与细胞表面特异位置结合的聚合物^[39]。

理想的生物黏附剂应该:

- 无毒,不被黏膜吸收,且对黏膜表面无刺激作用;
- 与黏膜上皮细胞表面形成强非共价键;
- 容易和药物结合,不妨碍药物释放;
- 存储时或放在货架上时不易降解。

聚合物的其余性质已经在前文提到。

药物从可溶性聚合物中释放,往往伴随着聚合物的逐步溶蚀分解。因此,药物释放机理为聚合物的降解和药物的扩散相结合。药物从不溶性水凝胶中释放符合 Fick 或非 Fick 扩散动力学方程^[40]。通过模拟药物的释放(起初的 60%)则定药物释放机理,经验公式如下

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (2)$$

式中: M_t/M_∞ 为药物释放分数; k 为动力学常数; t 为时间; n 为扩散指数。当 $n=0.5$ 时,药物的释放机制是 Fick 扩散;当 $0.5 < n < 1.0$ 时,为不规则转运(非 Fick 扩散);当 $n=1.0$ 时,为 II 类转运(case-II transport);当 $n > 1.0$ 时,为超 II 类转运(super case-II transport)^[41]。

剂型

目前已经发展了多种生物/黏膜黏附性的剂型,生物黏附的机制已经得到了阐明。

1. 口腔黏膜剂型

口腔黏膜表面光滑,不易流动,便于生物黏附剂型的放置。口腔黏膜剂型的大小限制了可以包载的药物总量。一般来说,日需求量不大于 25mg 的药物适用于口腔黏膜给药。半衰期较短、需要缓释/控释的药物,或者水溶性

较差和对酶比较敏感的药物也可以通过口腔黏膜成功转运。许多药物剂型在此领域得到发展,包括片剂、黏附性贴片、黏合凝胶剂和黏附膏剂等。通过调节背衬的宽度和通透性,可以实现黏附片/贴剂的单向释药和多向释药(图4)。

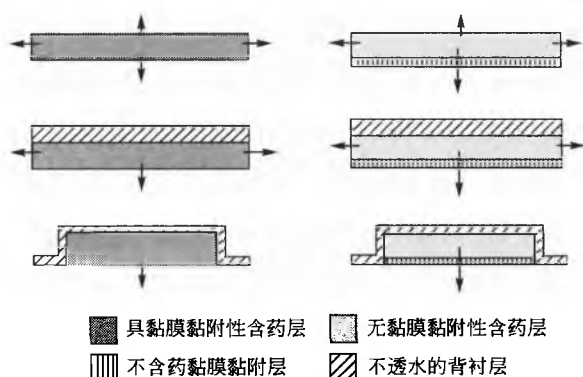


图4 口腔给药装置的平面设计示意图^[91]

2. 口腔黏膜制剂的处方开发

口腔黏附片、贴剂、凝胶和膏剂等新型制剂主要是为实现治疗性药物的全身给药而发展起来的。这些剂型也能实现药物的缓释。

口腔黏膜剂型可以是：①储库型；②骨架型。

2.1 储库型

储库型药物处方即将药物包裹在聚合物膜内，由膜控制药物的释放速率。如果聚合物膜控速、储库中药物过量，则储库型给药系统恒速释药。

2.2 骨架型

骨架型制剂的药物均匀地分布在聚合物内，药物释放受聚合物骨架的控制。分散在聚合物中的药物必须溶解在介质中，然后通过聚合物网络扩散。因此药物的分散区和耗尽区都存在于骨架中，流体动力学扩散薄层也存在于药物和骨架的界面上。当药物的耗尽区可以忽略时，骨架系统在初期可以恒速释药。

决定药物从给药装置中释放的速率的参数有聚合物的溶解度、聚合物的扩散率、聚合物扩散通道的厚度、药物的水溶性、分配系数以及水扩散系数等。最终，流体动力学扩散层的厚度、骨架系统的载药量、给药装置的表面积共同影响药物的释放速率。

2.3 口腔黏附片

口腔黏附片可以为单层或多层装置。单层片剂可以通过传统的制剂技术——直接压片法或湿法制粒法制备。片剂使大剂量药物成为可能。除了与黏膜的接触面外，其余面使用压制或喷雾包衣，包裹玻璃纸、氢化蓖麻油、聚四

氟乙烯、乙基纤维素等不透水物质，则可以实现药物的单向释放。多层片剂可以通过一层一层地向模具中加入处方成分并压制而得(图4)。这些片剂可以设计成全身给药或局部给药。对于多层片剂来说，将药物掺入到紧挨黏膜表面的黏附层，可以优化生物黏附性能。

2.4 口腔黏附贴剂

口腔黏附贴剂也可以是单层或多层储库或骨架型给药系统，应用于全身或局部给药。制备黏附贴片的方法主要有两种：溶剂涂布法和直接挤压法(有溶剂或无溶剂)。其半成品是一大张薄片，再冲切成贴片。背衬用于控制药物释放的方向，并防止给药装置在口中停留时的变形和瓦解。溶剂涂布法制备黏附贴剂，是将背衬层用框架固定在不锈钢板上，配置聚合物(不含药物)或药物/聚合物混合物的溶液，涂铺在背衬层上。然后通过注入恒温水流或用空气干燥法进行干燥。干燥温度根据处方中的赋形剂选择。完全干燥后，用适当的冲床和模具将薄片切割成所需的形状和尺寸。直接压制法制备黏附贴剂是将药物和生物黏附剂均匀混合(有溶剂或无溶剂)，用两个辊筒挤压而成。聚合物/药物混合物可以被压制所需的厚度，再切割或冲压成合适的尺寸。使用溶剂配备的聚合物/药物混合物还需要增加空气或烘箱干燥的步骤(图5)。



图5 黏膜黏附口腔贴剂的示意图^[81]

3. 实验设计

设计合理的实验，评价处方的体内外释放和黏膜通透性。

3.1 体外释放/通透性研究

药物的体外释放研究没有标准方法，需要根据剂型的形状和应用来设计。文献中报道的装置有 USP I/II 型溶出仪，也有将转篮浸入烧杯中，通过磁力搅拌或机械振摇以 50~250r/min 的转速旋转搅拌^[39]。涉及的测试介质很多，如蒸馏水、氯仿、磷酸盐缓冲液、生理盐水、甲醇与水的混合物等^[39]。药物体外释放的研究为了解给药装置的性质及药物从给药系统中释放的机理提供了很有价值的信息。

也可以通过玻璃扩散池研究体外通透性，扩散池一般有两个半室，半室内装满不断搅拌的缓冲液，而口腔黏膜组织放在两个半室之间。黏膜可以在狗、猪和家兔处死后，立即从颊部剥离而得。这种方法对于研究药物在组织中转运和代谢的同步过程很有意义。但是必须注意切除组织在体外的生物活性，可以运用电生理学性质来判断。持

T

续通入 O₂/CO₂ 混合物和向缓冲介质中加入葡萄糖有利于维持组织的生物活性。MTT 测定法和活性染色共焦成像法可以用来监测生物活性^[42]。另外,可以利用细胞培养技术,调整参数优化给药装置。这项技术有利于理解药物转运的机理并且为药物分子或给药装置的修饰提供了指导策略^[43]。

3.2 体内吸收的研究

动物试验:通过动物试验考察药物口腔黏膜吸收的研究较少。这可能是因为动物的口腔黏膜给药比较困难并且经常得到伪结果^[44]。选择的动物模型应该与人的吸收、组织、酶、角质化程度等情况接近。清醒或麻醉动物都可以用于研究。清醒的动物在实验前几天应连续服用安慰剂,然后在口腔黏膜上使用试验剂型。通过监测血浆或尿中药物的浓度以及实验后剂型中药物的残留量来考察药物的吸收。

人体试验:在剂型(药物释放、剂型形状、载药量等)优化、临床前动物毒理学实验完成后,进行人体研究。志愿者口腔黏膜用药后,定时监测剂型中的药物残留量,并且(或者)采集生物样品(血、尿等),用适当的药动学/药效学方法分析,观测药物的吸收过程。当吸收不是限速步骤,而且采取一定措施防止对药物/唾液溶液的吞咽时,剂型中残存的药量可以反映药物的吸收情况^[45]。

3.3 毒性和刺激性评价

刺激性非常主观,并且可能在实验组和对照组中存在很大的差异。大多数刺激是由渗透促进剂引发的。对毒性和刺激性的评价应该考虑到:①对黏膜组织的刺激;②对黏膜细胞的损伤程度;③复原的速度。

对黏膜组织的刺激:刺激是一种复杂的现象,它涉及赋形的溶解性、黏膜转运、生物转运和局部药物分布的相互作用。迄今为止,渗透促进剂的结构与其口腔黏膜给药后造成的刺激程度之间的关系式还未确定。有关离子化合物——苯甲酸衍生物的 pK_a 值与刺激程度之间的关系的报道,其刺激性通过红斑的程度来测量^[46,47]。含有烷基基的 azacycloalkanone 渗透促进剂的刺激性比带烯烷基的大^[48]。总之,最有效的渗透促进剂对口腔黏膜的刺激最大。

对口腔黏膜细胞的损伤程度:促渗剂可能通过以下途径改变保护性通透屏障的性能:①细胞间脂质流动性的增强(相对无毒);②细胞间脂质的提取或细胞间蛋白质的变性(损伤/毒性较大)。因此渗透促进剂必须:①作用可逆;②不被人体吸收;③不能引起累积毒性和屏障性质的永久性改变。在狗的舌上表面给予 1% 十二烷基硫酸钠或氯化十六烷基吡啶,会引起角蛋白的脱落、变粗和分离^[49]。在家

兔口腔黏膜给予 0.5% 脱氧胆酸钠或 0.1% 十二烷基硫酸钠,则引起上皮细胞脱落^[50]。牛磺胆酸钠和溶血磷脂酰氯可以增加狗口腔黏膜对胰岛素的吸收,而且对黏膜无刺激性^[51]。

评价膜损伤的方法:通常有几种方法用于评价各种渗透促进剂对生物膜的损伤程度,以下列举了一部分:

- (1) 用电扫描或透射电子显微镜进行形态学检查^[52];
- (2) 用光学显微镜和适当的染色法,如苏木精和曙红(H&E),进行形态学检查^[53];
- (3) 测定由渗透促进剂引起的溶血程度^[54];
- (4) 测定释放的细胞成分,如乳酸脱氢酶(LDH)^[55];
- (5) 测定膜的电阻变化;
- (6) 测定各种标记物的渗透性能改变,如胰岛素、甘露醇和 FITC-右旋糖酐;
- (7) 测定纤毛运动变化,如鼻黏膜。

黏膜的复原速度:复原速度与膜的损伤程度总的来说是呈负相关的,即与脱氧胆酸钠^[57]和聚氧乙烯-9-月桂醇醚相比,渗透促进剂酰基肉毒碱^[56]和甘氨酸胆酸钠造成的损伤小,因此恢复又快又好。紧密连接的通透性对细胞外的钙浓度十分敏感。如果细胞外钙浓度高,则紧密连接的重新结合速度加快,而细胞浆内钙浓度升高则没有这样的效果^[58]。

其他相关毒性:其他相关的毒性包括干涉正常代谢和黏膜细胞的功能(如吸收水分)^[59]。非结合型胆酸会阻碍氨基酸的代谢和葡萄糖的转运^[60]。在肝单加氧酶的作用下,促渗剂还有可能通过生物转化作用转变成毒性或致癌物质。促渗剂吸收入体循环也会引起毒性,比如月桂氮草酮和环己烷十二酰胺^[61]可以透过皮肤吸收。而且膜流动性的改变也可能改变与膜结合的转运蛋白质和酶的活性。

肽类和蛋白质的口腔黏膜给药

口腔黏膜给药避免了酸和酶的降解并绕开了肝的首过效应。然而与传统小分子药物相比,多肽和蛋白质药物脂溶性低,相对分子质量大,生物利用度往往很低(<5%)。蛋白质和多肽的酶(如氨基肽酶、羧肽酶、一些肽链内切酶和酯酶)降解也是其生物利用度低的原因之一。一般认为,多肽和蛋白质通过被动扩散跨口腔黏膜吸收,内吞作用在口腔黏膜上皮中并不明显。口腔黏膜上皮除了可以吸收一些氨基酸诸如谷氨酸(带负电荷)和赖氨酸(带正电荷)外,不存在主动或载体介导的多肽转运系统^[62]。总之,目前多肽和蛋白质的口腔黏膜给药应用于多个方面(表 1)。由表 2 可以看出,随着肽类相对分子质量的增大,生物利用度降低,这提示我们亲水性和球形的多肽和蛋白质是通过细胞旁路转运的。

表 1 肽类和蛋白质口腔黏膜给药的体内实验年份表

作者	年份 [参考文献]	肽类 (体内模型)
Dillon 等	1960 [63]	缩宫素 (人)
Miller	1973 [64]	催产素 (人)
Dawood 等	1980 [65]	催产素 (人)
Ishida 等	1981 [66]	胰岛素 (狗)
Anders 等	1983 [67]	普罗瑞林 (人)
Schurr 等	1985 [68]	普罗瑞林 (人)
Aungst 和 Rogers	1988 [69]	胰岛素 (大鼠)
Aungst 等	1988 [70]	胰岛素 (大鼠)
Nakada 等	1988 [71]	降钙素 (大鼠)
Oh 和 Ritschel	1988 [51]	胰岛素 (家兔)
Ritschel 等	1988 [72]	胰岛素 (狗)
Ho 和 Barsuhn	1989 [73]	普罗瑞林, 催产素 (狗)
Wolany 等	1990 [74]	奥曲肽 (狗)
al-Achi 和 Greenwood	1993 [75]	胰岛素 (大鼠)
Heiber 等	1994 [76]	降钙素 (狗)
Bayley 等	1995 [77]	重组人 α -干扰素 B/D 混合体 (大鼠, 家兔)
Gutnaik 等	1996 [78]	胰高血糖素样肽 I (人)
Nakane 等	1996 [79]	促黄体激素释放激素 (狗)
Hoogstraate 等	1996 [80]	布舍瑞林 (猪)
Li 等	1997 [81]	促甲状腺激素释放激素 (大鼠)
Li 等	1997 [53]	催产素 (家兔)
Alur 等	1999 [82]	降钙素 (家兔)

表 2 肽类和蛋白质口腔黏膜给药的体内实验数据

肽类/蛋白质	M_w/Da	种类				
		大鼠	家兔	狗	猪	人
TRH	362	—	—	—	—	4%
缩宫素	1007	—	0.1%	—	—	<10%
LHRH	1182	—	—	0.41% (单独) 0.34% ~ 1.62% (有促渗剂)	—	—
布舍瑞林 (LHRH 的类似物)	≈1182	—	—	—	1% (单独) 5% (有促渗剂)	—
降钙素	3432	—	16% 和 37%	550IU 超过 6h	—	—
GLP-1	4169	—	—	—	—	7% (7 ~ 36 个氨基酸碎片)
胰岛素	5808	0% (单独) 25% (有促渗剂)	0% (单独) 5% (有促渗剂)	0% (单独) 0.5% (有促渗剂)	—	0~4%
α -干扰素 B/D 混合体	19 000	<1%	<1%	—	—	—

1. 生物活性

在多肽和蛋白质类药物的传输中,生物活性是最重要的因素。由于在各种制备过程中,这些分子较敏感,易变性,所以制备方法很受限制。温度、压力、接触有机溶剂等过程变量都是加工过程中必须考虑到的因素。总之,以上提到的策略可以应用于发展多肽和蛋白质的处方,或者

可以根据特殊需要进行调整。

2. 温度

高温可以破坏原来的二硫键,形成新的二硫键,这种新的二硫键将蛋白质“锁”成变性的构象。低 pH、十二烷基硫酸钠、吐温 80、离液盐和外源性蛋白质等可以保护蛋白质不被高温灭活^[83]。30%~50%的乙二醇可以用作 β -

干扰素抗病毒活性的保护剂^[84]。人血清白蛋白可以增加人重组 $\beta_{\text{HET-17}}$ 干扰素的热稳定性^[47]。水溶性的多聚糖（如右旋糖酐、直链淀粉等）和定点突变^[85]也可以增强蛋白质和多肽类药物的热稳定性。

3. 压力

蛋白质对压力的改变并不敏感，只有当压力很大时，蛋白质才表现出在热或溶液 pH 改变时引起的变性，才能观测到构象变化^[86]。一种模型酶（蛋白质）——尿素酶，当压力低于 474mPa 时，活性基本上不会丧失；而压力超过 474mPa 时，将失去 50% 的相对活性^[87]。

4. 药代动力学和药效反应

药代动力学和药效反应必须分开来评价。筛选口腔黏膜药物首先要考虑的是由首过效应和胃肠道降解引起的较短的生物半衰期（ $t_{1/2}$ ）。随着 $t_{1/2}$ 的增大， t_{max} 和 C_{max} 也增大^[88]。通过口腔黏膜给药的肽类药物的吸收分数不应该只通过药效学反应的数据来计算，因为与药效学反应有关的多肽类药物的吸收效果不仅取决于总的吸收量，还取决于肽类被靶器官摄取的速率。可以用瞬时分析法来考察口腔黏膜给药后的药代动力学^[89]。

5. 酶的降解

口腔黏膜的蛋白水解活性是蛋白质和肽类药物转运的重要屏障。口腔黏膜匀浆法为研究口腔黏膜给药后肽类的生化降解速度和程度提供了原始数据^[90]。匀浆研究的不足之处是不能区分胞液中的、与细胞膜结合的以及细胞间的蛋白水解活性。由于蛋白质和肽类可以通过跨细胞或细胞旁路两种途径转运，所以了解蛋白水解酶的具体位置是非常重要的。

生物黏附性高聚物（如聚丙烯酸衍生物、聚卡波菲和卡波姆等）可以保护重要的蛋白质和多肽类药物不被蛋白水解酶、肽链内切酶（胰蛋白酶和 α -糜蛋白酶）、肽链端解酶（羧肽酶 A 和 B）以及微粒体和胞液的亮氨酸氨肽酶^[91]所破坏。然而，半胱氨酸蛋白酶（谷氨酸氨基肽酶）不能被聚卡波菲和卡波姆所抑制^[91]。

6. 酶抑制剂

蛋白酶抑制剂是最常用的酶抑制剂，包括抑肽酶^[79]、抑氨肽酶^[92]、软骨素酶和透明质酸酶等。据多次报道，当这些抑制剂与多种肽类同时给药时，抑制剂会缺乏足够的效能^[79]。

7. 渗透促进剂

总的来说，促渗剂有 6 种类型：①螯合剂，如 EDTA、EGTA；②表面活性剂，分非离子表面活性剂（如聚氧乙烯-9-月桂醇醚、聚山梨醇酯-80、蔗糖酯和十二烷基麦芽糖苷）和阳离子表面活性剂（如十二烷基甘氨酸胆酸钠、十二烷基硫酸钠）两种；③胆酸盐和其他甾体类清洁剂，如甘

胆酸钠、牛磺胆酸钠、皂角苷、牛磺双氢霉素钠和甘双氢霉素钠；④脂肪酸，如辛酸；⑤非表面活性剂，如月桂氮草酮、水杨酸盐和亚砷；⑥酶，如磷脂酶、透明质酸酶、神经氨酸酶和软骨素酶 ABC。

促渗剂促进药物吸收的机理不尽相同。大多数促渗剂破坏了脂质双分子层，增强了膜的流动性。有些促渗剂（非离子和弱离子表面活性剂）可能溶解和浸出脂质^[92]。胆酸盐通过形成胶束，稳定了对酶敏感的药物，抑制了蛋白水解酶的降解和蛋白质的聚合，增强了药物的吸收^[92]。由于口腔黏膜中的紧密连接较少，所以打开紧密连接的促渗剂对药物的口腔黏膜吸收意义不大。表 3 中的促渗剂的结构与促渗活性之间的关系目前尚无定论。然而，对表面活性剂来说，极性基团的结构对渗透性的影响较大。例如，据报道，醚类渗透促进剂比与其结构类似的酯类促渗剂的作用明显^[92]。

表 3 用于口腔黏膜给药的代表性吸收促进剂

类型	举例
螯合剂	EDTA
表面活性剂	苯扎氯铵、苜泽 35、聚氧乙烯-9-月桂醇醚、十二烷基硫酸钠
胆酸盐	脱氧胆酸钠，甘氨酸胆酸钠
脂肪酸	肉豆蔻酸钠
肽酶抑制剂	抑肽酶
其他	软骨素酶 ABC，月桂氮草酮，环糊精，皂树皂苷，水杨酸钠

总结

近年来，对药物（尤其是多肽和蛋白质）的吸收机理的理解有了突破性进展。不同学科的科学家用连续阐明了与口腔黏膜给药的最佳处方和药物转运有关的变量。对药物的跨细胞和细胞旁路转运途径、降解肽类的蛋白水解酶的活性、化合物在黏膜转运过程中的同时降解等几个方面的进一步理解是口腔黏膜给药系统发展的基础。而且，增大药物通量（如使用渗透促进剂）而没有相关毒性的方法、使蛋白水解酶失活的策略、控释制剂和生物黏附性剂型的创新，都将促进药物通过口腔的转运。

参考文献

1. Rathbone, M. J.; Drummond, B. K.; Tucker, I. G. The Oral Cavity as Site for Systemic Drug Delivery. Adv. Drug Del. Rev. 1994, 13, 1-22.
2. de Vries, M. E.; Bodde, H. E.; Verhoef, J. C.; Junginger, H. E. Developments in Buccal Drug Delivery. Crit. Rev. Ther. Drug. Carr. Syst. 1991, 8, 271-303.
3. Merkle, H. P.; Anders, R.; Wermerskirchen, A. Muco-adhesive Buccal Patches for Peptide Delivery. Bioadhesive

- Drug Delivery Systems; Lenaerts, V., Gurney, R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1990; 105.
4. Chen, S. Y.; Squier, C. A. The Ultrastructure of the Oral Epithelium. The Structure and Function of Oral Mucosa; Meyer, J., Squier, C. A., Gerson, S. J., Eds.; Pergamon, NY, 1984; 7.
 5. Harris, D.; Robinson, J. R. Drug Delivery Via the Mucous Membranes of the Oral Cavity. *J. Pharm. Sci.* 1992, 81, 1—10.
 6. Moffat, A. C. Absorption of Drugs Through the Oral Mucosa. *Top Med. Chem.* 1972, 4, 1.
 7. Beckett, A. H.; Hossie, R. D. Buccal Absorption of Drugs. *Handbook of Pharmacology*; Brodie, B. B., Gillette, J. R., Eds.; Springer: NY, 1971; 25.
 8. Siegel, I. A.; Hall, S. H.; Stambaugh, R. Permeability of the Oral Mucosa. *Current Concepts of the Histology of Oral Mucosa*; Squier, C. A., Meyer, J., Eds.; Charles C. Thomas: IL, 1971; 274.
 9. Dali M. M.; Heran C. L.; Kaeppli M.; Stetsko P. L.; Smith R. L. Intra-Oral (Buccal/Sublingual) Bioavailability of Propranolol in Conscious Rabbits as a Function of PH and Dosing Variables Proceedings of the American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting New Orleans LA Nov 19 — 23 1999, 1394, Abstract Number 2559.
 10. Evered, D. F.; Sadoogh-Abasian, F.; Patel, P. D. Absorption of Nicotinic Acid and Nicotinamide Across Human Buccal Mucosa In Vivo. *Life Sci.* 1983, 27, 1649—1661.
 11. Evered, D. F.; Mallet, C. Thiamine Absorption Across Human Buccal Mucosa In Vivo. *Life Sci.* 1983, 32, 1355—1358.
 12. Gandhi, R. B.; Robinson, J. R. Oral Cavity as a Site for Bioadhesive Drug Delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* 1994, 13, 43—74.
 13. Junginger, H. E.; Hoogstraate, J. A.; Verhoef, J. C. Recent Advances in Buccal Drug Delivery and Absorption-In Vitro and In Vivo Studies. *J. Control. Rel.* 1999, 62, 149—159.
 14. Squier, C. A.; Johnson, N. W.; Hopps, R. M. Human Oral Mucosa Development, Structure and Function; Blackwell Scientific: Oxford, 1976; 7.
 15. Edgar, W. M. Saliva; Its Secretion, Composition and Functions. *Br. Dent. J.* 1992, 172, 305—312.
 16. Beckett, A. H.; Triggs, E. J. Buccal Absorption of Basic Drugs and Its Application as an In Vivo Model of Passive Drug Transfer Through Lipid Membranes. *J. Pharm. Pharmacol.* 1967, 19, 31S—41S.
 17. Al-Sayed-Omar, O.; Johnston, A.; Turner, P. Influence of PH on the Buccal Absorption of Morphine Sulfate and Its Major Metabolite, Morphine-3-Glucuronide. *J. Pharm. Pharmacol.* 1987, 39, 934—935.
 18. Anders, R.; Merkle, H. P. Evaluation of Laminated Muco-Adhesive Patches for Buccal Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* 1989, 49, 231—240.
 19. Kornfeld, R.; Kornfeld, S. Comparative Aspects of Glycoprotein Structure. *Annu. Rev. Biochem.* 1976, 45, 217.
 20. Peppas, N. A.; Buri, P. A. Surface, Interfacial and Molecular Aspects of Polymer Bioadhesion on Soft Tissues. *Advances in Drug Delivery Systems Controlled Release Series*; Anderson, J. M., Kim, S. W., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1986; 1, 257.
 21. Chen, J. L.; Cyr, G. N. Compositions Producing Adhesion Through Adhesion. *Adhesive Biological Systems*; Manly, R. S., Ed.; Academic Press: NY, 1970; 163, Chap. 10.
 22. Smart, J. D.; Kellaway, I. W.; Worthington, H. E. C. An In Vitro Investigation of Mucosa-Adhesive Materials for Use in Controlled Drug Delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 1984, 36, 295—299.
 23. Barrer, R. M.; Barrie, J. A.; Wong, P. S. L. The Diffusion and Solution of Gases in Highly Crosslinked Copolymers. *Polymers* 1968, 9, 609—627.
 24. Park, K.; Ch'ng, H. S.; Robinson, J. R. Alternative Approaches to Oral Controlled Drug Delivery Bioadhesives and In Situ Systems. *Recent Advances in Drug Delivery Systems*; Anderson, J. M., Kim, S. W., Eds.; Plenum Press: NY, 1984; 163.
 25. Park, K.; Robinson, J. R. Bioadhesive Polymers as Platforms for Oral Controlled Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* 1984, 19, 107—127.
 26. Gurny, R.; Meyer, J. M.; Peppas, N. A. Bioadhesive Intraoral Release Systems; Design, Testing, and Analysis. *Biomaterials* 1984, 5, 336—340.
 27. Ch'ng, H. S.; Park, H.; Kelley, P.; Robinson, J. R. Bioadhesive Polymers as Platforms for Oral Controlled Drug Delivery II: Synthesis and Evaluation of Some Swelling, Water-Insoluble Bioadhesive Polymers. *J. Pharm. Sci.* 1985, 74, 399—405.
 28. Flory, P. J. Principles of Polymer Chemistry; Cornell University Press: NY, 1953; 541.
 29. Park, H.; Robinson, J. R. Physicochemical Properties of Water Insoluble Polymers Important to Mucin/Epithelial Adhesion. *J. Control. Rel.* 1985, 2, 47—57.
 30. Smart, J. D.; Kellaway, I. W. In Vitro Techniques for Measuring Mucoadhesion. *J. Pharm. Pharmacol.* 1982, 34 (Suppl.), 70.

T

31. Mikos, S. A.; Smart, J. D. Scaling Concepts and Molecular Theories of Synthetic Polymers to Glycoprotein Networks. *Bioadhesive Drug Delivery Systems*; Lenarts, V., Gurney, R., Eds.; CRC Press: Boca Raton FL, 1990; 25.
32. Mortazavi, S. A.; Smart, J. D. Factors Influencing Gel-Strengthening at the Mucoadhesive-Mucus Interface. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994, 46, 86—90.
33. Teng, C. L. C.; Ho, N. F. L. Mechanistic Studies in the Simultaneous Flow and Adsorption of Polymer Coated Latex Particles on Intestinal Mucus. *J. Control. Rel.* 1987, 6, 133—149.
34. Park, K. A. A New Approach to Study Mucoadhesion: Colloidal Gold Staining. *Int. J. Pharm.* 1989, 53, 209—217.
35. Hassan, E. E.; Gallo, J. M. A Simple Rheological Method for the In Vitro Assessment of Mucin-Polymer Bioadhesive Bond Strength. *Pharm. Res.* 1990, 7, 491—495.
36. Kamath, K. R.; Park, K. Mucosal Adhesive Preparations. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*; Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1994; 10, 133.
37. Ch'ng, H. S.; Park, H.; Kelly, P.; Robinson, J. R. Bioadhesive Polymers as Platforms for Oral Controlled Drug Delivery II: Synthesis and Evaluation of Some Swelling, Water-Insoluble Bioadhesive Polymers. *J. Pharm. Sci.* 1985, 74, 399—405.
38. Khosla, R.; Davis, S. S. The Effect of Polycarbophil on the Gastric Emptying of Pellets. *J. Pharm. Pharmacol.* 1987, 39, 47—49.
39. Ahuja, A.; Khar, R. K.; Ali, J. Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Drug Dev. Ind. Phar.* 1997, 23, 489—515.
40. Lee, P. I. Kinetics of Drug Release from Hydrogel Matrices. *Advances in Drug Delivery Systems*; Anderson, J. M., Kim, S. W., Eds.; (Controlled Release Series) Elsevier: Amsterdam, 1986; 1, 277.
41. Peppas, N. A.; Sahlin, J. J. A Simple Equation for the Description of Solute Release. III. Coupling of Diffusion and Relaxation. *Int. J. Pharm.* 1989, 57, 169—172.
42. Imbert, D.; Cullander, C. Buccal Mucosa In Vitro Experiments. I. Confocal Imaging of Vital Staining and MTT Assays for the Determination of Tissue Viability. *J. Control. Rel.* 1999, 58, 39—50.
43. Audus, K. L.; Bartel, R. L.; Hidalgo, I. J.; Borchardt, R. T. The Use of Cultured Epithelial and Endothelial Cells for Drug Transport and Metabolism Studies. *Pharm. Res.* 1990, 7, 434—451.
44. Pitha, J.; Harman, S. M.; Michel, M. E. Hydrophilic Cyclodextrin Derivatives Enable Effective Oral Administration of Steroidal Hormones. *J. Pharm. Sci.* 1986, 75, 165—167.
45. Merkle, H. P.; Anders, R.; Wermerskirchen, A.; Raechs, S. Buccal Route of Peptide and Protein Drug Delivery. *Peptide and Protein Drug Delivery*; Lee, V. H. L., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1990; 545.
46. Lee, V. H. L. Peptide and Protein Drug Delivery; Lee, V. H. L., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1990; 1.
47. Berner, B.; Wilson, D. R.; Guy, R. H.; Mazzenfa, G. C.; Clarke, F. H.; Maibach, H. I. The Relationship of pKa and Acute Skin Irritation in Man. *Phar. Res.* 1988, 5, 660—663.
48. Okamoto, H.; Hashida, M.; Sezaki, H. Structure-Activity Relationship of 1-Alkyl- or 1-Alkenylazacycloalkanone Derivatives as Percutaneous Penetration Enhancers. *J. Pharm. Sci.* 1988, 77, 418—424.
49. Siegel, I. A.; Gordon, H. P. Effects of Surfactants on the Permeability of Canine Oral Mucosa In Vitro. *Toxicol. Lett.* 1985, 26, 153—158.
50. Oh, C. K.; Ritschel, W. A. Biopharmaceutic Aspects of Buccal Absorption of Insulin. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 1990, 12, 205—212.
51. Ritschel, W. A.; Ritschel, G. B.; Forusz, H.; Kraeling, M. Buccal Absorption of Insulin in the Dog. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1989, 63, 53—67.
52. Sithigornugul, P.; Burton, P.; Nishihata, T.; Caldwell, L. Effects of Sodium Salicylate on Epithelial Cells of the Rectal Mucosa of the Rat: A Light and Electron Microscopic Study. *Life Sci.* 1983, 33, 1025—1032.
53. Li, C.; Bhatt, P. P.; Johnston, T. P. Transmucosal Delivery of Oxytocin to Rabbits Using a Mucoadhesive Buccal Patch. *Pharm. Dev. Technol.* 1997, 2, 265—274.
54. Longenecker, J. P.; Moses, A. C.; Flier, J. S.; Silver, R. D.; Carey, M.; Dubovi, E. J. Effects of Sodium Taurodihydrofusidate on Nasal Absorption of Insulin in Sheep. *J. Pharm. Sci.* 1987, 76, 351—355.
55. Sakai, K.; Kutsuna, T. M.; Nishino, T.; Fujihara, Y.; Yata, N. Contribution of Calcium Ion Sequestration by Polyoxyethylated Nonionic Surfactants to the Enhanced Colonic Absorption of p-Aminobenzoic Acid. *J. Pharm. Sci.* 1986, 75, 387—390.
56. Fix, J. A.; Engle, K.; Porter, P. A.; Leppert, P. S.; Selk, S. J.; Gardner, C. R.; Alexander, J. Acylcarnitines: Drug Absorption-Enhancing Agents in the Gastrointestinal Tract. *Am. J. Physiol.* 1986, 251, G332—G340.



57. Hersey, S. J.; Jackson, R. T. Effect of Bile Salts on Nasal Permeability In Vitro. *J. Pharm. Sci.* 1987, 76, 876–879.
58. Pitelka, D. R.; Taggart, B. N.; Hamamoto, S. T. Effects of Extracellular Calcium Depletion on Membrane Topography and Occluding Junctions of Mammary Epithelial Cells in Culture. *J. Cell Biol.* 1983, 96, 613–624.
59. Teem, M. V.; Phillips, S. F. Perfusion of the Hamster Jejunum with Conjugated and Unconjugated Bile Acids: Inhibition of Water Absorption and Effects on Morphology. *Gastroenterology* 1972, 62, 261–267.
60. Clark, M. L.; Lanz, H. C.; Senior, J. R. Bile Salt Regulation of Fatty Acid Absorption and Esterification in Rat Everted Jejunal Sacs In Vitro and into Thoracic Duct Lymph In Vivo. *J. Clin. Invest.* 1969, 48, 1587–1599.
61. Tang-Liu, D. D. S.; Neff, J.; Zolezio, H.; Sandri, R. Percutaneous and Systemic Disposition of Hexamethylene Lauramide and Its Penetration Enhancement Effect on Hydrocortisone in a Rat Sandwich Skin-Flap Model. *Pharm. Res.* 1988, 5, 477–481.
62. Gandhi, R. B. Some Permselectivity and Permeability Characteristics of Rabbit Buccal Mucosa; Ph. D. Thesis, University of Wisconsin, Madison, 1990.
63. Dillon, T. F.; Douglas, R. G.; du Vigneaud, V.; Barber, M. L. Transbuccal Administration of Pitocin for Induction of Labor. *Obstet. Gynecol.* 1960, 15, 587–592.
64. Miller, G. W. Induction of Labor by Buccal Administration of Oxytocin; Review of 50 Cases. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 1973, 72, 1110–1113.
65. Dawood, M. Y.; Ylikorkala, O.; Fuchs, F. Plasma Oxytocin Levels and Disappearance Rate After Buccal Pitocin. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1980, 138, 20–24.
66. Ishida, M.; Machida, Y.; Nambu, N.; Nagai, T. New Mucosal Dosage Form of Insulin. *Chem. Pharm. Bull.* 1981, 29, 810–816.
67. Anders, R.; Merkle, H. P.; Schurr, W.; Ziegler, R. Buccal Absorption of Protirelin; An Effective Way to Stimulate Thyrotropin and Prolactin. *J. Pharm. Sci.* 1983, 72, 1481–1483.
68. Schurr, W.; Knoll, B.; Ziegler, R.; Anders, R.; Merkle, H. P. Comparative Study of Intravenous, Nasal, Oral, and Buccal TRH Administration Among Healthy Subjects. *J. Endocrinol. Invest.* 1985, 8, 41–44.
69. Aungst, B. J.; Rogers, N. J. Site Dependence of Absorption-Promoting Actions of Laureth-9, Na Salicylate, Na₂EDTA, and Aprotinin on Rectal, Nasal, and Buccal Insulin Delivery. *Pharm. Res.* 1988, 5, 305–308.
70. Aungst, B. J.; Rogers, N. J.; Shefter, E. Comparison of Nasal, Rectal, Buccal, Sublingual, and Intramuscular Insulin Efficacy and the Effects of a Bile Salt Absorption Promoter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988, 244, 23–27.
71. Nakada, Y.; Awata, N.; Nakamichi, C.; Sugimoto, I. The Effect of Additives on the Oral Mucosal Absorption of Human Calcitonin. *J. Pharmacobiol. Dyn.* 1988, 11, 395–401.
72. Ritschel, W. A.; Ritschel, G. B.; Forusz, H.; Kraeling, M. Buccal Absorption of Insulin in the Dog. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1989, 63, 53–67.
73. Ho N. F. H.; Barsuhn C. L. Buccal Delivery of Drugs Proceeding of the International Symposium on Controlled Release Bioactive Materials CH–Basel 1989; 16, 24.
74. Wolany G. J. M. Munzer J. Rummelt A. Merkle H. P. Buccal Absorption of Sandostatin (Octreotide) in Conscious Beagle Dogs Proceeding of the International Symposium on Controlled Release Bioactive Materials CH–Basel 1990; 17, Abstract D341.
75. al-Achi, A.; Greenwood, R. Buccal Administration of Human Insulin in Streptozocin-Diabetic Rats, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1993; 82, 297–306.
76. Heiber, S. J.; Ebert, C. D.; Dave, S. C.; Smith, K.; Kim, S. W.; Mix, D. In Vivo Buccal Delivery of Calcitonin. *J. Control. Rel.* 1994, 28, 269–270.
77. Bayley, D.; Temple, C.; Clay, V.; Steward, A.; Lowther, N. The Transmucosal Absorption of Recombinant Human Interferon-Alpha B/D Hybrid in the Rat and Rabbit. *J. Pharm. Pharmacol.* 1995, 47, 721–724.
78. Gutniak, M. K.; Larsson, H.; Heiber, S. J.; Juneskans, O. T.; Holst, J. J.; Ahren, B. Potential Therapeutic Levels of Glucagon-Like Peptide I Achieved in Humans by a Buccal Tablet. *Diabetes Care* 1996, 19, 843–848.
79. Nakane, S.; Kakumoto, M.; Yukimatsu, K.; Chien, Y. W. Oramucosal Delivery of LHRH; Pharmacokinetic Studies of Controlled and Enhanced Transmucosal Permeation. *Pharm. Dev. Technol.* 1996, 1, 251–259.
80. Hoogstraate, A. J.; Coos Verhoef, J.; Pijpers, A.; van Leengoed, L. A.; Verheijden, J. H.; Junginger, H. E.; Bodde, H. E. In Vivo Buccal Delivery of the Peptide Drug Buserelin with Glycodeoxycholate as an Absorption Enhancer in Pigs. *Pharm. Res.* 1996, 13, 1233–1237.
81. Li, C.; Koch, R. L.; Raul, V. A.; Bhatt, P. P.; Johnston, T. P. Absorption of Thyrotropin Releasing Hor-

T

- mone in Rats Using a Mucoadhesive Buccal Patch. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1997, 23, 239—246.
82. Alur, H. H.; Beal, J. D.; Pather, S. I.; Mitra, A. K.; Johnston, T. P. Evaluation of a Novel, Natural Oligosaccharide Gum as a Sustained-Release and Mucoadhesive Component of Calcitonin Buccal Tablets. *J. Pharm. Sci.* 1999, 88, 1313—1319.
83. Sedmak, J. J.; Grossberg, S. E. Interferon Stabilization and Enhancement by Rare Earth Salts. *J. Gen. Virol.* 1981, 52, 195—197.
84. Knight, E., Jr.; Fathey, D. Human Fibroblast Interferon: An Improved Purification. *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 3609—3611.
85. Wells, J. A.; Powers, D. B. In Vivo Formation and Stability of Engineered Disulfide Bonds in Subtilisin. *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 6564—6570.
86. Kornblatt, M. J.; Hoa, G. H. B. The Pressure-Induced Inactivation of Mammalian Enolases is Accompanied by Dissociation of the Dimeric Enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 1987, 252, 277—283.
87. Teng, C. L. D.; Groves, M. J. The Effect of Compactional Pressure on Urease Activity. *Pharm. Res.* 1988, 5, 776—780.
88. Alur, H. H.; Pather, S. I.; Mitra, A. K.; Johnston, T. P. Trans mucosal Sustained Delivery of Chlorpheniramine Maleate in Rabbits Using a Novel, Natural Mucoadhesive Gum as an Excipient in Buccal Tablets. *Int. J. Pharm.* 1999, 188, 1—10.
89. Kondo, S.; Sugimoto, I. Moment Analysis of Intravenous, Intraduodenal, Buccal, Rectal, and Percutaneous Nifedipine in Rats. *J. Pharmacobio. Dyn.* 1987, 10, 462—469.
90. Yamamoto, A.; Hayakawa, E.; Lee, V. H. Insulin and Proinsulin Proteolysis in Mucosal Homogenates of the Albino Rabbit: Implications in Peptide Delivery from Nonoral Routes. *Life Sci.* 1990, 26, 2465—2474.
91. Luessen, H. L.; Verhoef, J. C.; de Boer, G.; Junginger, H. E.; de Leeuz, B. J.; Borchard, G.; Lehr, C. M. Multifunctional Polymers for the Peroral Delivery of Peptide Drugs. *Bioadhesive Drug Delivery Systems*; Mathiowitz, E., Chickering, D. E., III, Lehr, C. M., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1999; 299.
92. Lee, V. H. L. Enzymatic Barriers to Peptide and Protein Absorption. *CRC Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* 1988, 5, 69—97.
93. Smart, J. D. An In Vitro Assessment of Some Mucosa Adhesive Dosage Forms. *Int. J. Pharm.* 1991, 73, 69—74.

(陈芳译)



替代药物

Kristi L. Lenz
Medical University of South Charleston, South Carolina, U. S. A.

引言

虽然替代药物具有最悠久的历史，但它是在常规药物技术快速发展的背景下得到普及的。对于常规的卫生保健从业者来说，很难认可替代药物，因为在常规的医学院和医科大学极少提供替代药物的培训。

对于药学从业者来说，草药有相互矛盾之处。天然药物的生药学研究，是药学研究中的一个历史性领域。另外，很多常规药物来源于草药或其他植物。然而，近些年来，药学为支持临床实践而忘了“本”，而且大多数药剂师具备的草药知识非常少。不管药剂师的知识水平如何，或者对草药是否有用存有偏见，事实是更多的患者正在使用草药。这有时是在冒严重毒性的危险。所有的卫生健康从业者，尤其是药剂

师，需要提高草药知识以便更好地护理患者。

定义

1. 替代医疗

这一类医疗实践通常被称为“补充和替代医疗”，也被称为“非传统的”、“非正统的”、“未经证实的”，甚至“江湖医生的行径”。因为这些词语具有明显的贬义，所以偏向用“替代医疗”这类词。替代药物不是一种药物形态，而是在医疗机构认为惯例或常规以外的多种健康实践^[2]，范围从家庭治疗到产品的制造，从患者自我治疗到由熟练的从业者治疗，从有效的到潜在的危险的实践。美国使用的更普通的替代医疗实践的明确定义列于表 1 中^[1]。

表 1 补充和替代医疗实践^[1]

实 践	定 义
针刺疗法	古代中国使用针刺穿皮肤的技术 接进一网格流动能量（“气”）控制器官功能
用香料按摩	使用植物油和香精油治疗物理和心理病症
印度草医学	“生命知识” 古代印度使用饮食、锻炼、瑜伽、冥想、草药和按摩治疗物理、情感、精神上协调的不平衡
生物电磁学	活的生物体和他们之间的电磁场相互作用的研究相信磁场穿透身体和治愈损伤的组织
脊椎指压治疗法	医师使用推拿术治疗脊骨、关节和肌肉病症
草药	制成药丸的植物或植物提取物用于预防和治疗物理和心理病症
同种疗法	“以毒攻毒” 相信极小剂量的物质能够用来治疗那些在高剂量下引起的不良反应 制剂可能稀到其活性成分都不再残留
冥想	相信精神能影响健康和控制生理反应
物理疗法	依赖于饮食、禁食、按摩、草药、同种疗法和其他自然治疗
整骨疗法	从业者使用推拿术加速从疾病或损伤中康复 从业者还接受常规医药培训和开处方
反射疗法	按摩脚上的反射点刺激特殊器官
保健按摩	按摩师在患者身上一点一点地移动手，使混乱的能量场重新排列或除去“阻塞”

2. 草药

虽然替代医疗包含十分广泛的实践范围（实际上超过 150 种），但最让药学从业者感兴趣的领域还是草药。有趣的是，在任何联邦法规或 FDA 条款中都没有“草药”的定义。定义随着来源而变化显著。例如，植物学家将草药定义

为一种植物，其茎在冬天枯萎（比较树和灌木而言）。相反，生药学家将草药定义为气生植物部分（相对种子和根而言）^[3]。草药贸易协会——对这个定义具有经济学兴趣的组织，将草药定义为一种植物或植物的一部分，或者植物提取物用来作香料、香味剂或者医疗用。无论如何，草药意味着将整个植物或植物的一部分用于治疗，而不是来源于植物的

单一的活性成分。

T

草药使用的重要性

1. 使用的流行程度

Eisenberg 等在 1990 年和 1997 年进行了电话调查,以确定替代药物的使用在美国的流行程度。1990 年调查的参与者超过 1500 人,接着在 1997 年的调查又超过 2000 人。被调查的参与者报告,在过去 12 个月使用过至少一种替代药物的比例 1990 年为 34%,1997 年为 42%^[4,5]。这就是常说的统计“有 1/3 的美国人使用替代药物”。草药的使用,从 1990 年的仅仅 2.5%,增加到 1997 年的 12%,使之成为美国使用替代药物中增长最快的替代医疗实践。

2. 使用者的人口统计学

根据 Eisenberg 等进行的调查,替代药物使用者倾向于受过教育的青年到中年人、女性以及有慢性疾病的人。他们 90%都是自己决定,意味着他们主要的保健医师不参与决定寻求替代医疗帮助。

替代医疗的使用因患者人群不同而存在差异。例如,高达 80%的癌症患者报告使用替代治疗,而一般人群只有 1/3^[7~10]。调查还发现有 2/3 的人使用草药。有趣的是,癌症患者在使用替代治疗时,并没有放弃常规治疗,有近 90%的患者同时使用常规治疗和替代治疗^[4,6,9]。使用草药时,能潜在地增加与常规药之间的相互作用。实际上,在 Eisenberg 1997 年的调查中,有 20%的参与者承认,与草药一起使用常规处方药。因为不到 10%的草药使用者是在草药专家的指导下使用,药剂师通常是唯一能帮助防止潜在的、危险的药物不良反应和相互作用的卫生从业者。与癌症患者相似,有很大比例(45%)的 AID 患者也报告使用替代治疗^[11]。在那些患者中,2/3 使用草药,而且大部分是在使用常规 HIV 治疗的同时使用替代治疗。

为什么使用替代治疗,患者给出的理由包括以下几点:感觉常规治疗无效和(或)有毒;当没有有效的常规治疗时产生挫折感;期望在他们自己的治疗中采取一种更积极的治疗方式;对常规治疗医生的不信任;相信替代治疗从业者将患者作为一个整体来关注^[6,10]。虽然多数患者仍然使用常规治疗同时使用替代治疗,但只有 1/3 的患者告诉他们的常规治疗医生是这样做的^[4,5,8]。这也意味着药剂师可能是唯一既知道患者的常规治疗也了解其替代治疗的卫生从业者。

3. 费用

据估计每年有 200 亿美元以上用于替代治疗^[5]。60%的患者自费支付所有的费用,只有 20%的患者接受健康维护组织(HMO)和第三方付款人提供的这些保健费用中的部分费用^[5]。另据估计,每年有 10 亿~50 亿美元用于草药供应,有趣的是,只有不到 5%的使用草药的患者报告说他们在药房购买这些产品。

4. 药剂师知道什么

假设草药补充使用和误用的潜在危险在增加,那么希望药学专业人员应该准备应付大家所需要的可靠的草药信息。遗憾的是,事实并非如此。密西西比大学在 1998 年做的一次调查发现,只有 2%的药剂师对他们的草药知识有信心^[12]。在卡罗尼亚州北部和维吉尼亚对 5 种最普通的草药补充品进行了另一次的“15 分”调查^[13]。在 164 个参与者中,68%在社区工作,74%销售草药。然而,15 分测试的平均分数只有 6.3 分,表明药剂师所具备的指导患者用草药的知识并不充分^[13]。

大家也希望药学院增加对药学专业的学生在草药方面的教育,以使能针对客户需求做更充分的准备。要做这点改变也是很慢的,在这个领域详细著作非常少。然而,1997 年做了一项调查,询问大学课程表中关于替代医疗课程的情况,虽然有 3/4 的大学说他们教替代医疗,但只有 1/3 的课程是必修课,而且不到 40%的内容是关于草药的^[12]。关于一项乳腺癌患者调查的统计比较发现,71%的草药使用者认为草药是“非常安全的”,事实并非如此^[10]。除非药剂师接受过草药的使用、毒性和潜在药物相互作用的教育,否则他们将不能帮助患者防止草药的有害作用。

规章和注意事项

1. 国家补充和替代医疗中心(NCCAM)

联邦政府出于对政府机关监察替代药物信息发布的需求进行了解,于 1998 年成立了 NCCAM,它前身是 1992 年成立的替代医疗办公室。作为国立卫生研究院(NIH)的一部分^[12],NCCAM 的任务是“为大家提供关于补充和替代医疗的安全性和有效性的可靠信息”,重点是临床试验申办者提供这方面的信息^[2]。NCCAM 的预算从 1992 年的 200 万美元增加到 2000 年的近 7000 万美元,几乎一半的预算是资助同行审核。NCCAM 还向大众提供信息散发、赞助商的印刷品评估,而且还为替代医疗担当国际联络。NCCAM 实际上将替代医疗分为 7 个主要种类:①医疗实践的替代系统(如生命吠陀医学和中医);②生物电磁学;③饮食和营养(如长寿法);④草药;⑤人工康复法(如脊椎挤压治疗法和保健按摩);⑥精神/身体技术(如瑜伽和冥想);⑦药理学和生物学治疗(如鲨鱼软骨)^[2]。更多关于 NCCAM 的明确信息可在 <http://nccam.nih.gov/> 网页找到。

2. 营养补充品的健康和教育法令

大家可能会设想联邦政府也会在管理那些能潜在导致严重损害的物质(如草药治疗)方面起重要作用。虽然 FDA 确实是想把草药监控提高到一个更高的水平,但是,迫于政治压力而通过的一项立法,使得草药补充品的供应更为广泛,审查更松。这个法规便是营养补充品的健康和教育法令(DSHEA)。



在 DSHEA 之前, 草药曾经先后作为药品、食品 (或) 食品添加剂管理。一些事件导致 DSHEA 的通过。在 1990 年, 有 258 种 OTC 药物成分因有效性数据不充分而被 FDA 禁止销售。其中 85 种成分来源于草药。生产商有的把那些产品撤市, 但严重的是, 有的却把这些产品作为“营养”补充品出售。这些引起了 FDA 的注意, 在 David Kessler 议员公开建议草药补充品应执行药品同样的标准, 也就是说, 须证明草药是安全和有效的, 否则就得撤出市场。这些评论导致更多公众对草药持续供应的关注, 而且很多信件写给国会成员。1994 年迫于政治压力, DSHEA 得以通过。

DSHEA 是一个两党联立法案, 由美国犹他州的 Orrin Hatch 和爱荷华州的 Tom Harkin 共同提案。首先, 它将“营养补充品”的定义放宽到包括任何一种营养补充产品, 包含以下一种或多种组分: 一种维生素、矿物质、草药、植物、氨基酸、或者任何一种代谢成分或提取物。FDA 必须证明其为不安全的, 才能撤出市场。这与药品相反, 证明 (安全性和有效性) 的任务由生产商承担。补充品的标签必须包含“未经 FDA 评价, 本品不能用于诊断、治疗、治愈或预防疾病”。还必须标明“营养补充品”或“草药补充品”, 标签上还必须有用通用名、拉丁名、数量和使用的植物部分。只要不宣称有保健和治疗作用, 可以作为营养补充品销售。因此, 结构/功能声明是允许的, 标签可以陈述诸如“振奋情绪”或“维持心血管健康”等内容。然而, 治疗疾病声明是禁止的。例如, 补充品标签不可以陈述“治疗抑郁”或“降低胆固醇”^[3,14]。

3. 规章的局限性

在 DSHEA 的现行草药法规中有几项条款的局限性可能引起对患者损害。

首先, 植物药材命名未标准化。草药通用名不同国家有不同名字。一种草药可以有超过一打通用名 (如紫锥菊), 或一种通用草药名可以指几种不同种类 (如北美黄连和蛇根草)。为避免混淆, 美国草药产品协会 (AHPA) 出版了《草药贸易》(*Herbs of Commerce*), 一本超过 500 种草药的书籍, 有首选的通用名、拉丁名和合适的同义名词。

其次, FDA 还没有要求草药补充品生产实行质量管理规范 (GMP)。这意味着无法保证草药补充品标签上的内容, 实际上就是瓶子内的内容。对于这一点, 一个例子就是 Girley 等发表的一份测定 20 种减肥草药补充品中麻黄碱含量的研究^[15], 其中有 10 种 (50%) 补充品实际与标明的麻黄碱的含量之间有超过 20% 的差异; 有四种产品具有明显的批与批之间差异; 有一个产品麻黄碱的含量是标签的 10 倍。有趣的是, 还有一种产品根本不含麻黄碱^[15]。

再次, 安全性保证是 FDA 的职责, 而不是生产商的。这意味着在一种产品撤出市场之前, FDA 必须积累足够的证据证明这种物质是不安全的。另外, 为帮助专业人员, 发表了《植物性安全手册》(*The Botanical Safety Handbook*), 总结了超过 600 种草药的安全性资料。然而, 还无法

保证某个特定的产品是安全的。一个例子是最近由 FDA 召回的 PD-SPES (由黄芪、三七、菊花、大青叶、灵芝、甘草、冬凌草共 7 味中药和 1 味美国草药棕榈子组成的中药复方醇水提取物) 补充品^[16]。PD-SPES 是一种由八种草药组成的混合物, 能治疗前列腺癌。PD-SPES 具有雌激素活性, 这也许是由于前列腺癌有效的原因^[17]。然而, 在加利福尼亚卫生局进行的实验室分析发现, 召回的产品被华法林污染^[16]。这意味着即使 PD-SPES 被认为是安全的, 任何一种特定产品都可能含有其他潜在有害物质。

最后, 草药补充品的有效性很难确立。很多关于草药使用的报道有数百年, 实质上是像轶事一样。因为大部分草药补充品不能取得专利权, 因此大医药公司不愿进行必需的随机、安慰剂对照的临床试验。为克服这个问题, 1978 年德国政府成立了 E 委员会以评价草药的安全性和有效性。到目前为止, 评价了 300 多种草药, 且在 1998 年翻译成英文。不幸的是, 大部分消费者无法阅读这些专题文章, DSHEA 要求的对草药产品结构/功能的声明, 向消费者传递了模糊的潜在危险信息, DSHEA 的用语增加了患者损害的潜在可能。例如, 松果菊 (紫锥花) 经常被作为“提高”免疫系统的补充品上市。这可能导致 HIV 患者相信松果菊可能提高他们已经减弱的免疫力。实际上, 恰恰相反, 松果菊可能减少 HIV 患者 CD4 细胞数量, 导致感染的危险增加^[18]。

常用的草药补充品

许多草药补充品能在 OTC 买到。对于所有这些草药补充品的讨论超出本文章范围。下面所列的是对每一种更常见和更常用的补充品的简单的讨论, 包括已知活性组分、药理学、剂量、支持的临床文献、不良反应和与常规药物的相互作用的说明。已知的和潜在的药物和草药相互作用均概括于表 2 中。

表 2 报道的和潜在的草药-药物相互作用^[18~22]

草药	相互作用的药物与药物类别	作用
脱氢表雄酮	抗糖尿病药	抑制降血糖效果
大蒜	阿司匹林, 非甾体抗炎药	增强抗血小板作用
	氯吡格雷, 噻氯匹定	增强抗血小板作用
	华法林	出血危险增加
姜	阿司匹林, 非甾体抗炎药	增强抗血小板作用
	氯吡格雷, 噻氯匹定	增强抗血小板作用
	华法林	出血危险增加
人参	阿司匹林, 非甾体抗炎药	增强抗血小板作用
	抗糖尿病药	增强降血糖作用
	氯吡格雷, 噻氯匹定	增强抗血小板作用
	中枢兴奋剂, 咖啡因	增加中枢神经系统毒性

续表

草药	相互作用的药物与药物类别	作用
人参	皮质激素	增加中枢神经系统毒性
	地高辛	错误显示血药水平高
	单胺氧化酶抑制剂	增加毒性
	华法林	出血危险增加
银杏	抗惊厥剂	降低抗癫痫发作作用
	阿司匹林, 非甾体抗炎药	增强抗血小板作用
	氯吡格雷, 噻氯匹定	增强抗血小板作用
	华法林	出血危险增加
绿茶	华法林	降低抗凝血效果
山楂	降血压药	低血压
	地高辛	增强收缩作用
麻醉椒	中枢抑制剂, 乙醇	促进镇静, 有昏迷危险
	肝毒素	增强肝脏毒性
甘草	降血压药	拮抗降血压效果
	皮质激素	增加盐皮质激素作用
	地高辛	低血钾引起的毒性
	利尿剂	增加低血钾作用
麻黄	中枢兴奋剂, 咖啡因	增加中枢兴奋作用
	地高辛	增加毒性
	单胺氧化酶抑制剂	高血压危象
褪黑激素	中枢抑制剂, 乙醇	促进镇静
圣约翰草	环孢素	降低浓度和药效
	地高辛	降低浓度和药效
	茚地那韦, 奈韦拉平	降低浓度和药效
	单胺氧化酶抑制剂	增加单胺氧化酶抑制剂毒性
	口服避孕药	降低浓度和药效
	辛伐他汀	降低浓度和药效
	选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂	增加 5-羟色胺综合征的危险
	华法林	降低浓度和药效
缬草	中枢抑制剂, 乙醇	促进镇静

注: 抗糖尿病药物包括胰岛素、格列吡嗪、格列本脲和二甲双胍; 非甾体抗炎药包括布洛芬、萘普生和双氯芬酸; 中枢兴奋剂包括伪麻黄碱、右美沙芬、茶碱和咖啡因; 单胺氧化酶抑制剂和中枢抑制剂包括地西泮、巴比妥和乙醇; 选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂包括舍曲林、氟西汀和氟苯哌苯醚。

1. 黑升麻

黑升麻也称为黑蛇根草、驱虫草、虫草、响尾草。不应

与蓝升麻混淆, 后者是一种子宫的刺激剂, 曾用于诱导分娩。黑升麻被用于治疗更年期症状、包括热潮红/过度出汗、情绪不稳、睡眠改变^[23]。其确切的活性成分还不清楚, 但根据包括三萜皂苷 (诸如黄肉楠碱、27-脱氧升麻烷、脱氧乙酰丙醇及黑升麻苷)、植物甾醇和根部提取物中发现的异黄酮^[18,23], 很多年来, 认为黑升麻一定是雌激素, 但最近更多的动物和人体资料显示其药理学不涉及雌激素。这点由近期一项对照试验得到确认, 对伴有治疗相关的潮热的乳腺癌患者, 其效果与安慰剂对照无差异^[23]。然而, 这种产品被认为对这些患者是安全的。没有注意到两组之间黄体生成素 (LH) 和卵泡刺激素 (FSH) 水平的变化, 显示有限的雌激素活性^[24]。研究最多的剂量范围是 20~40mg, 每天两次^[18,23]。2 周内可能看到最初的效果, 但是最大的效果一般需连续治疗 8 周^[23]。黑升麻耐受性非常好, 只有轻度的胃肠道反应。没有长期数据, 应该建议患者限制使用不超过 6 个月。另外, 近期资料表现, 未发现黑升麻作为雌激素刺激乳腺癌或子宫内膜癌细胞^[23,24]。然而, 这种草药应该避免用于孕妇, 因为曾有流产报道。黑升麻没有已知的草药-药物相互作用^[18]。然而, 应该告知绝经期患者, 黑升麻不是雌激素替代治疗的直接替代品, 因为还没确定其对骨质疏松症和心血管疾病的好处^[23]。

2. 脱氢表雄甾酮 (DHEA)

脱氢表雄甾酮不是真正的草药, 而是一种天然的肾上腺类固醇物质。另外, DHEA 是男性 50% 雄性激素、经前期妇女 75% 雌激素和绝经期后妇女 100% 雌激素的前体类固醇, 在 20~30 岁之间达到高峰水平, 然后以每年大约 2% 的水平下降^[25]。众所周知, 激素水平随年龄增加而下降, 因此 DHEA 常被称为“抗衰老”的补充物。绝对没有关于这方面的效果的临床试验发表过。另外, DHEA 水平在慢性疾病状态下更低, 包括一些癌症、心血管疾病、系统性红斑狼疮 (SLE)、阿尔茨海默病和渐进性 HIV 疾病。DHEA 在治疗 HIV 患者疲劳、治疗中年患者消沉和 SLE 方面进行了小规模试验^[25]。对于 DHEA 不足患者 (由于长期使用皮质类固醇或慢性疾病) 的替代剂量, 男性为 20~50mg/d, 女性为 10~30mg/d^[25]。上述其他症状的剂量要高出很多, 从 200mg/d 到 500mg/d^[25]。不良反应与雄性激素产物增加直接相关, 包括痤疮、失眠、易怒、多毛症^[18,25]。或许, DHEA 最严重的、潜在的不良反应是对激素依赖的癌症如前列腺、乳房、子宫内膜的刺激。因为这些可能性, 具有这些危险因素或有这些肿瘤个人史的患者不应该使用 DHEA^[18,25]。未曾报道过 DHEA 引起草药-药物相互作用。但是, DHEA 是细胞色素 P450 3A4 同工酶系的轻度抑制剂, 而且可能轻度增加代谢药物的浓度^[18]。

3. 松果菊 (窄叶松果菊、苍白松果菊和紫松果菊)

松果菊还有许多其他通用名, 包括美国金菊花、黑桑普森、黑苏珊、鸡冠花、印度头、堪萨斯蛇根草、紫金菊花、红向日葵、审视根 (survey root) 和桑普森根^[18]。松果菊被



用作非特异免疫刺激物,有几种活性成分。咖啡酸衍生物和高分子量多糖刺激巨噬细胞和自然杀伤细胞的噬菌作用。松果菊也能促进 α -干扰素和白介素-1的生成。另外,松果菊含有抗炎特性的烷酰氨基化合物^[26]。草药使用部分是根或根部的新鲜汁液和茎部。大多数上市产品是装在胶囊里的干燥的根。由于其活性成分不溶于水,酊剂和茶剂不具同样效果。松果菊的最好的形式是用45%的乙醇以1:1或1:5的酒精提取物,剂量通常是1~2mL,每天3~4次。研究的大多数适应证包括预防高危患者的病毒性上呼吸道感染(URI)的辅助治疗和减轻感染的严重程度。最有价值的资料是关于治疗方面,而不是预防方面。1997年来发表的随机试验的最新综述发现,两项试验是否定的,三项试验是肯定的。肯定的试验发现松果菊能减少URI症状的频率、病程和强度^[27]。对于这种适应证,患者要求在症状开始时就使用松果菊治疗,持续到症状消失后24h^[26]。对于预防,研究证实“感冒和流感”季节,每天服用松果菊,坚持8周,然而,由于资料不足,一般不推荐使用于这种适应证^[18]。患者可能出现过敏反应,但很少有关于松果菊的其他不良反应的报道^[26]。也有一些关于持续使用8周以上出现免疫抑制的报道,应该避免长期使用松果菊。尚没有发现药物与松果菊相互作用,但有几个疾病状态不能使用松果菊。HIV患者应该避免使用松果菊,因为它可能增加 α -干扰素水平,继而减少CD4数量。还有,因为它具有免疫刺激的作用,患有自身免疫疾病(如多发性硬化症、胶原-血管疾病)的患者不应该服用松果菊^[18,26]。有趣的是,有一项对妊娠期妇女服用松果菊的对照试验。观察400多名妇女妊娠结果:200名服用松果菊,200名不服用。两组自发流产率和胎儿畸形率没有差异,表明在妊娠期谨慎使用松果菊是安全的^[28]。对于其他草药产品尚无怀孕期间服用的文献报道。

4. 夜来香油 (EPO)

夜来香油是根据植物的花命名的,其花在午后开放,也被称为纯正百宝丹^[18]。种子含有7%~10%的 γ -亚油酸(GLA),一种人体必需的 Ω -6脂肪酸。人体依赖亚油酸到 γ -亚油酸(GLA)的代谢转换,而在很多疾病状态,包括乳房纤维囊性疾病、糖尿病神经病变和各种皮肤病(如特应性皮炎、湿疹),这种转换不完全^[18]。在许多小的试验中,人们研究过EPO用于这些适应证以及经前综合征。虽然可能要服用6个月或更长时间来观察其效果,但对各种乳腺疾病试验的结果是肯定的。EPO的剂量每天2~4g(相当于GLA 200~400mg),分成2~3次。治疗神经病变的剂量一般更高^[18]。所有这些剂量,EPO均能良好耐受,只产生轻微胃肠道不适和头痛,应该与食物同时服用EPO。另外,EPO没有已知的禁忌证,也没有报道与草药-药物相互作用^[18]。

5. 大蒜 (葱属植物)

大蒜的活性成分是由蒜素组成的,一种鳞茎里的复合物经蒜素酶转化成蒜素^[18]。在食物准备阶段,当鳞茎/小鳞茎被粉碎的时候,这种转化即已发生。这种转化也可能发生在

胃肠道里,虽然有胃酸存在时转化会减少。摄取新鲜大蒜被认为是使用这种草药治疗相关适应证的最有效的方式,虽然有多种片剂、胶囊、酊剂、汁等可供使用。使用不新鲜的大蒜时,因为蒜素的不稳定性,应该避免使用酊剂和油剂。由干燥的鳞茎粉碎后压成片剂而制成肠衣片,也比较有效,因为它们能够避免胃酸的作用。大蒜在治疗血脂异常和高血压方面的研究最多,但在血压方面的作用未被完全证实。然而,最近一项对13个随机试验的综合分析中,大蒜被发现能适度降低(20%)总胆固醇和甘油三酯^[29]。使用剂量范围600~900mg/d,相当于4g/d新鲜大蒜小鳞茎^[29]。另外,从最近一篇对45个试验的综述文章中发现,使用大蒜治疗不仅能降低总胆固醇、LDL胆固醇和甘油三酯,还能减少血小板聚集,对血糖没有作用。大蒜不良反应极少,除胃肠道反应(如烧心感、胃肠胀气)外,还有特征性的体臭。据报道,接触性皮炎可使用大量的新鲜大蒜小鳞茎处理^[18]。还有,大蒜抑制血小板聚集,这可能引起与其他抗血小板和抗凝血药物相互作用^[18]。

6. 生姜 (生姜成药)

生姜使用的是其根部,含1%~3%姜醇。根干燥后,姜醇转化成姜烯酚和姜油酮,但这种转化的临床意义尚不清楚^[31]。姜醇能刺激胃肠道上部自主运动,类似胃复安的作用^[31]。这带来生姜最普通的适应证,即止吐。生姜对大脑里化学受体激发区没有中枢作用。运动病和孕妇晨吐的剂量是1~4g/d新鲜生姜或者500~1000mg/d干燥的粉末状的生姜根。日服用量一般分成2~4剂。对于运动病,生姜优于安慰剂,在一些小试验中,甚至优于乘晕宁^[31]。最近一项的对70位有晨吐反应的孕妇的随机试验也发现生姜对减少恶心和呕吐的作用,优于安慰剂^[32]。生姜还被研究用于术后恶心/呕吐,但没有肯定的结果。生姜还作为治疗骨关节炎药上市,但这方面适应证的资料还不充分^[18,31]。没有观察到生姜的明显不良反应。生姜可能轻微抑制血小板聚集,因此,存在与药物潜在的相互作用。抗血小板方面的资料不如大蒜、高丽参、银杏充分。

7. 银杏

银杏树又叫乳树、铁线蕨树、化石茎^[18]。这是最古老的树种,最大的商业化银杏树农场是在南卡罗莱纳州的Sumter。银杏最普通的适应证是提高心理能量,以及治疗脑血管和外周血管疾病。这可能是由于类黄酮的益处和萜类化合物(银杏内酯及其他)抑制血小板刺激因子、增加脑循环、抑制动脉痉挛、降低毛细血管渗透性和脆性、改善脑缺氧耐受。银杏还可起自由基清除剂作用^[18]。推荐使用银杏的种子和叶子的提取物,标准应含有24%类黄酮和6%萜类化合物。研究得最多的片剂含有40mg这种提取物。用于认知功能全面改善方面的研究不多,但有几项阿尔茨海默病的试验。剂量为40~80mg,每天3次,3个月或更长时间内使认知技能改善^[18,33]。另外,采用综合分析方法(meta-analysis),分析用40mg银杏,每天3~4次治疗间歇性跛行的八项随机试

验,结果表明该剂量明显地改善了无痛行走的距离^[34]。报道的银杏不良反应包括恶心/呕吐、腹泻和癫痫发作,这是因为过量或过多摄入了银杏籽,而不是银杏叶。还有术后出血过多的事件报道,可能是由于银杏抗血小板作用^[35]。由于这种抗血小板作用,可能存在在这种草药与常规抗凝血剂和抗血小板药的相互作用。

8. 人参

被称为“人参”的草药因命名不一致而会导致危险。实际上有三种草药使用这种通用名:美国人参或西洋参(花旗参)、亚洲人参或中国参(人参 *Panax ginseng*)和西伯利亚人参(苏联人参),它们虽然是相关植物种类但有很多不同^[18]。在本章中,人参指美国人参和亚洲人参,因为它们具有很相似的治疗作用和不良反应。人参活性成分是从根部提取的12种人参皂苷^[18]。人参作为提高身体和精神表现的产品上市,人参皂苷是中枢神经系统(CNS)刺激剂。然而,这些化合物的治疗效果的资料有限。近期一项试验,对83例健康青年(平均年龄26岁)以2种剂量的人参(200mg/d和400mg/d)与安慰剂比较,心理状态无差异^[36]。对人参的不良反应报道有许多,包括胸痛、心悸、高血压、头痛、失眠、易怒、焦虑、低血糖症、虚弱和胃肠道反应(如恶心、呕吐和腹泻)。报道的和潜在的药物相互作用与人参的抗血小板和CNS刺激作用有关^[18]。由于这些不良反应比以前讨论过的其他草药发生得更频繁,服用人参应该小心,特别是有心血管或CNS疾病的患者。

9. 氨基葡萄糖/软骨素

氨基葡萄糖是一种内源性氨基单糖,用于软骨蛋白多糖的合成,蛋白多糖在骨关节炎中耗尽^[37]。当前骨关节炎常规治疗只是支持疗法,包括使用对乙酰氨基酚或非甾体消炎药(NSAID)。这些药物减轻与疾病有关的疼痛和炎症,但不改变疾病整个过程^[37]。另外,氨基葡萄糖可能加快软骨制造,至少减缓破坏,也起轻度抗感染作用^[37]。软骨素是从牛气管软骨中提取的,能增加软骨中胶原的合成^[18]。与安慰剂和NSAID相比用单独使用每一种产品进行的短期试验,已经表明了适度的结果。一项对15项随机安慰剂对照试验的综合分析是有效的,全部有利于氨基葡萄糖/软骨素,但作者注意到这种偏差可能是因为几乎所有的试验都是由生产商主办的^[38]。他们承认在骨关节炎方面的有效性似乎是“很可能”^[38]。但是,软骨素对口服片剂而言,其额外的益处充其量也是最微少的,因为氨基葡萄糖95%吸收,而软骨素口服生物利用度最小^[18]。这种化合物耐受良好,只产生轻度头痛、恶心/呕吐和偶见皮疹^[18]。关节炎基金会不推荐使用这种补充品,但由于其不良反应很少,对其他常规止痛剂不耐受的患者进行一项试验也不是不切实际的。剂量通常根据体重而定,范围从1000~2000mg/d,分次服用^[18]。但对长期使用的情况,没有长期研究的报道。有资料报道动物高血糖反应,因此糖尿病患者应该严密监测血糖水平^[18]。

10. 葡萄籽

葡萄籽种的提取物含有黄酮类化合物以及一些必需脂肪酸和生育酚。黄酮类化合物被认为是最主要的活性成分,抑制脂质过氧化反应。与维生素E相关的生育酚,也是天然抗氧化物质^[18]。研究最多的使用葡萄籽的患者人群是心血管疾病患者,尤其是高脂血症患者。剂量为25~300mg/d。虽然常规临床资料有限,但没有关于葡萄籽的不良反应和药物相互作用的报道^[18]。

11. 绿茶

绿茶经烘烤而得,即在干燥这种草药叶子之前,使其枯萎,然后发酵。这种程序被认为能够保持新鲜叶子中所含茶多酚的活性。大部分茶叶的标准是含60%茶多酚,被认为具有抗氧化、降脂、潜在抗癌作用^[18]。绿茶还含有1%~4%甲基黄嘌呤,包括咖啡因。观察绿茶有效性的临床试验非常少,但人们认为观察有效性,显效消耗量(每天6~10杯)是必需的^[18]。最近进行了一项对患有难控制的实体瘤的患者的一期试验,5%的稳定型病例没有发生副反应^[39]。毒性剂量与咖啡因相关,最大耐受剂量相当于每天7~8杯绿茶。奶制品可能抑制绿茶中的茶多酚,应避免同时使用。仅有罕见的过敏反应的报道。因为很多草药茶是不含咖啡因的,应建议患者饮用中等咖啡因含量的绿茶^[18]。绿茶可能还含有相当的维生素K,因此,可能会抑制华法林的作用^[40]。

12. 卡瓦胡椒

卡瓦胡椒属于黑胡椒科,也被称为ava、awa、kew、sakaw、tonga和yagona^[18]。其根部含有卡瓦吡喃酮,可抑制边缘系统。卡瓦胡椒还是镇静剂,能轻度提升情绪。卡瓦胡椒作为抗焦虑药和治疗抑郁和失眠症药上市^[41]。剂量范围60~120mg/d,临睡时使用^[18]。但是,最近将几种潜在危险的事件归因于卡瓦胡椒。卡瓦胡椒引起的毒性反应有镇静、视觉改变、运动反射变慢^[41]。对于卡瓦胡椒和阿普唑仑同时使用,有昏迷的报道。另外,FDA正在研究在欧洲发生的至少25例归因于卡瓦胡椒的肝脏毒性事例^[16]。卡瓦胡椒与其他CNS镇静剂,尤其是苯二氮卓类,或肝毒素同时使用时应小心。卡瓦胡椒不会引起心理依赖^[18]。

13. 麻黄

麻黄也称为brigham茶、沙漠茶、fen-phen药、嫁接冷杉、墨西哥茶、长叶麻黄茶、天然销魂草、popotillo、乌贼卵、老婆茶、卡车驾驶员茶和黄马^[18]。活性成分麻黄素,于19世纪分离得到,20世纪广泛用于减轻鼻塞和作为中枢神经系统(CNS)激动剂。麻黄种子和茎的提取物含有0.5%~2.5%的生物碱,不仅包括麻黄素,还有伪麻黄碱、甲基麻黄碱和去甲麻黄碱,都是CNS激动剂,作用与安非他明和咖啡因类似。尽管麻黄由于中毒的危险不再用于传统的减轻鼻塞,但普遍用于许多草药减肥产品中。这是因为麻黄能抑制食欲和增强代谢。麻黄的产品有胶囊、片剂和酏

剂。FDA 建议消费者在 24h 内服用不要超过 24mg，连续使用不超过 7d^[18]。麻黄主要的问题是毒性较强，它是 CNS 激动剂，能引起忧虑、混乱、头痛、失眠和兴奋。当麻黄和咖啡因一起服用时作用更是显著增强。另外，麻黄有重要的心血管作用，通常当超过每日最高剂量时，会出现高血压、心动过速、心肌梗死和心动停止。这些可能的致命作用在早先的年轻健康者身上已有报道。一项针对 1997~1999 年两年间与服用麻黄有关的 98 个事件的评估发现，有 47% 的有心血管作用，主要是高血压，还有心悸和心动过速；18% 的 CNS 作用，包括中风和癫痫发作；有 10 例死亡^[42]。所有这些副作用也可能导致与其他的兴奋剂发生草-药相互作用。另外，患有青光眼、心血管疾病、甲状腺疾病、精神病、多尿症或前列腺疾病的患者应避免使用麻黄。由于麻黄具有潜在性的子宫收缩和早产作用，孕妇也不应服用^[18]。FDA 仍在调查由麻黄引起的所有严重副作用的报告，至今有 800 多份，将来有可能在市场上禁止这种产品^[18]。

14. 褪黑激素 (N-乙酰基-5-甲氧基色胺)

褪黑激素不是草药，而是一种在松果腺中由色氨酸产生的天然激素，也可化学合成。内源性的褪黑激素在睡眠期间释放，在白天的水平较低^[18,43]。作为一种补充剂，褪黑激素研究用于预防/治疗时差反应和镇静-催眠。对于时差反应，患者应在旅行前三天，每天临睡前服用 5mg，持续到旅行结束后三天。褪黑激素水平随年龄增长而下降，所以在具有睡眠障碍的老年患者身上进行了研究。这类患者对褪黑激素的作用更敏感，因此，应该使用更低的起始剂量，一般临睡前 1~2mg^[43]。患有肝脏疾病的患者使用褪黑激素时应小心，因为肝脏对该化合物的清除削弱了。报道的使用褪黑激素的不良反应包括头痛、疑惑、镇静和轻微的体温降低。应避免同时使用 CNS 抑制剂时，包括酒精。

15. 奶蓟草 (水飞蓟)

奶蓟草也称为圣母蓟、玛丽蓟、圣母玛利亚蓟、圣玛利亚蓟^[18]。其活性成分水飞蓟素已被提取和结构测定很多年。这种草药只有果实中含有 1%~4% 活性成分，为三种相关化合物的混合物：水飞蓟宾、水飞蓟宁、水飞蓟亭^[44]。水飞蓟素可能对稳定肝细胞膜起作用，还能刺激 RNA 聚合酶，辅助肝细胞损伤后的肝再生。水飞蓟素是一种自由基清除剂。有趣的是，奶蓟草是仅知道的一种极毒的蘑菇、伞形毒菇的解毒剂，解毒方式是静脉注射水飞蓟素，这只在欧洲使用。奶蓟草也已上市，研究用于治疗急性慢性酒精和滤过性毒菌引起的肝炎，以及治疗氟哌啶醇和丙氯拉嗪肝毒性^[44]。对奶蓟草能否减少急性病毒性肝炎的并发症，并能否改善酒精性肝炎的肝功能进行过观察。然而，没有观察到幸存者受益于奶蓟草^[44]。治疗肝脏疾病研究最多的剂量是 140mg 水飞蓟素，每天 3 次，即 200mg 奶蓟草提取物中标准含 70% 的水飞蓟素^[18]。应避免使用茶剂作为一种剂型，因为水飞蓟素不溶于水。奶蓟草没有已知的草药-药物相互作用，毒性也很小，包括腹泻和偶见的过敏反应。由于奶蓟草能引起子

宫收缩，因此应避免用于孕妇^[18]。

16. S-腺苷甲硫氨酸 (SAME)

SAMe 是一种内源性物质，由三磷酸腺苷和氨基酸甲硫氨酸生成。在体内参与很多的生物过程^[45]。作为一种补充剂，主要研究用于治疗忧郁症和肝脏疾病。在最近的一项综合分析中发现每天 400~1600mg 优于安慰剂，且与中等剂量的三环抗抑郁药一样有效^[45]。对患有肝脏疾病的患者进行的一些小试验，证明每天 1600mg 或更大剂量能改善肝酶^[45]。由于生物利用度限制，SAMe 之前只用于静脉用药。目前也有肠衣片，但缺乏生物利用度研究。剂量应该逐渐增加，起始剂量为 200mg/d，以后每 1~2 周增加 200mg^[45]。SAMe 耐受性良好，作为不良反应记录的只有轻微胃肠道不适，没有药物相互作用^[45]。

17. 锯草

锯草也称为甘蓝棕榈菜和美国矮棕榈树。其熟浆果被认为含有活性成分（可能是脂肪酸和甾醇）；然而，其准确的活性成分还不清楚^[18]。由于假设与常规药物非那雄胺一样的机理，抑制 5- α 还原酶，锯草主要用于治疗良性前列腺增生^[46]。研究得最多的剂量是 160mg/d。在最近一项对 18 个随机试验的综合分析中，锯草改善泌尿道症状程度类似非那雄胺，优于安慰剂^[46]。锯草耐受性良好，会引起轻微腹痛、恶心/呕吐，偶有性欲减低^[46]。由于生育缺陷的危险，孕妇应该避免使用锯草^[18]。没有药物相互作用的报道。然而，锯草将降低前列腺特异抗原水平，这个试验用于诊断前列腺癌。由于会出现假阴性结果，有这种风险的男性应该避免使用锯草。

18. 圣约翰草

圣约翰草也称为 Klamath 草和野甘草^[18]。本品曾经用于很多方面，但近期最多的是作为抗抑郁剂上市。实际上，在德国比所有的常规抗抑郁药卖得多。其活性成分是金丝桃素，起弱单胺氧化酶抑制剂 (MAOI) 和选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂 (SSRI) 作用，也轻微抑制多巴胺和去甲肾上腺素再摄取^[18]。圣约翰草剂型有很多，如片剂、茶剂、酊剂和天然干草药。为达到最好效果，应该服用含 0.3% 金丝桃素的片剂。Lichtwer 药业的 Kira[®] 被研究得最多^[18]。300mg 圣约翰草，每天 3 次的随机、安慰剂对照试验发现其用于轻到中度抑郁症，优于安慰剂。反应率一般认为次于常规抗抑郁药，包括三环类抗抑郁药和 SSRI^[47,48]。另外，圣约翰草不是没有毒性。报道的不良反应包括头晕、头痛、失眠、不安、口干和光敏感^[18]。或许最重要的是报道过的草药-药物的相互作用。圣约翰草是一种重要的细胞色素 P450 3A4 酶系统诱导剂，60% 的常规药物由这个酶系统代谢。有几例关于临床上有重要意义的血清环孢素浓度降低、引起移植器官排斥的报道。茛地那韦浓度下降也有报道，潜在可能导致 HIV 治疗失败和耐药性^[51]。其他通过 3A4 代谢的药物，包括华法林、地高辛、口服避孕药和辛伐他汀，可能会因圣约翰草的影响药物浓度降低^[18]。最后，因为圣约翰草

的弱单胺氧化酶抑制和选择性 5-羟色胺再摄取抑制作用, 圣约翰草不应该与 MAOI 和 SSRI 同时服用^[18]。

19. 缬草

缬草也被称为万灵草药、amantilla、baldrianwurzel、缬草^[18]。缬草根提取物含环烯醚萜三酯(缬草素), 能刺激 γ -氨基丁酸(GABA)的释放^[52], 这与苯(并)二氮草药理学作用类似^[18]。小鼠的药理研究证实缬草素减少苯(并)二氮停药症状。作为一种镇静/催眠剂, 缬草素剂量范围 400~900mg/d, 临睡前服用。安慰剂对照试验规模很小, 且有不同结果。一些试验显示睡眠质量提高, 减少睡眠等待时间, 然而其他试验显示与安慰剂比较无差异^[52]。使用缬草素作

为抗焦虑药的资料也同样很少。对于在发生焦虑之前想用缬草素的患者, 应该告知他们缬草素的效果可疑且服用剂量比镇静剂小得多, 有焦虑反应发生之前 90min 服用 100mg^[52]。有过报道的不良事件包括镇静、视觉改变、头痛、偶见过敏反应、恶心/呕吐和肝毒性。应避免与其他 CNS 镇静剂同时使用, 包括酒精。

20. 潜在的不安全的草药

任何草药使用不正确时都可能不安全或者引起严重不良事件。然而, 表 3 所列的草药, 更普遍地被报道引起严重或威胁生命的事件, 很多已被列入 FDA 官方不安全草药目录^[18]。

表 3 潜在的不安全的草药^[18,53~56]

有害作用	通用名	拉丁名	毒性成分	严重不良反应	注释
抗胆碱能	颠茄	茄属颠茄	叶和根部 0.3%~0.6% 的莨菪碱	抗胆碱能毒性	5~50mg 时毒性作用
	南蛇藤龙葵属植物	茄属白英苷	茎和未成熟的浆果中的澳洲茄碱	抗胆碱能毒性	≥10 颗浆果的毒性, 成人致命剂量~200 颗浆果
	黑龙葵属植物	龙葵	茎、根和未成熟的浆果中 2% 的澳洲茄碱	抗胆碱能毒性	少于颠茄的毒性
	莨菪	天仙子	叶部 0.04%~0.28% 的莨菪碱	抗胆碱能毒性	强于颠茄的镇静作用
	曼陀罗	曼陀罗	熟种子、叶和花部 0.1%~0.6% 的莨菪碱	抗胆碱能毒性	种子可以咀嚼或者叶子闻起来像雪茄
	曼陀罗花	曼陀罗草	根部 0.4% 的莨菪碱	抗胆碱能毒性	强于颠茄的镇静作用
胆碱能	毒扁豆	毒扁豆属	成熟种子中的毒扁豆碱	胆碱能毒性	咀嚼种子以释放更多毒扁豆碱
心脏毒性	(苏格兰)金雀花	金雀花	2% 酪胺和气生部分 0.01%~0.22% 金雀花碱	(一)-inotrope、奎尼丁样抗心律不齐	使用 ≥30mg 原药材时有毒性作用
	(加拿大)大麻	印地安麻	在根部和气生部分的强心苷	心搏徐缓, 心脏房室传导阻滞 (A-Vblock)	比毛地黄少的心脏毒性
	毛地黄	毛地黄	在成熟种子、叶子和花中的强心苷	心搏徐缓, 心脏房室传导阻滞 (A-Vblock)	在美国毛地黄 <i>ianata</i> 是地高辛的主要来源
	蒿芥	钻果大蒜芥	在气生部分的强心苷	心搏徐缓, 心脏房室传导阻滞 (A-Vblock)	避免与其他芥类混淆
	铃兰	铃兰	在成熟种子、叶子和花中的强心苷	心搏徐缓, 心脏房室传导阻滞 (A-Vblock)	剪切的花中的水也有毒性
	乌头	乌头	在根、叶子和花中的乌头碱	低温、心搏徐缓、呼吸停止	成人致命剂量 ≥2mg; 局部使用也有毒性
	桂竹香属	桂竹香	在成熟种子和花中的强心苷	心搏徐缓、心脏房室传导阻滞 (A-Vblock)	
	马钱子	马钱子属	成熟种子和树皮 2%~5% 的马钱子碱	高热、激动、发作	使用 30~50mg 时有毒性作用; 成年人致命剂量 1~2g
神经毒性	苦艾草	艾属	叶子和花中的挥发性油中的苦艾醇	谵妄、精神病、肾功能不全、黄视症	苦艾醇与樟脑有关

续表

有害作用	通用名	拉丁名	毒性成分	严重不良反应	注释
胃肠道毒性	罂粟科植物	血根草	根部 4%~7% 的血根草碱	组织刺激和局部使用时的坏死	不充分吸收
	蓖麻子	蓖麻	42%~55% 蓖麻油和成熟种子中 0.1%~0.7% 蓖麻毒蛋白	泻药	咀嚼种子释放蓖麻毒蛋白
	药喇叭	药薯根	根部 12%~15% 聚酯糖苷类	泻药	
	驴蹄草	驴蹄草	新鲜花中的原白头翁素	皮肤起泡、黏膜刺激	草花具有很少的毒性
	草乌柏	草乌柏属	根汁中的双萜酯	感染和黏膜刺激	
肝脏毒性	白菖蒲	菖蒲	根油中的 β -异细辛醚；白菖蒲 <10%，千里光 0%，angustatin>80%	潜在的致肝癌物	活性成分与蛇根碱有关
	小榭树	小榭树	叶子中的去甲氢化愈创木脂酸	胆汁淤积、潜在的致肝癌物	
	雏菊	茺荑	在气生部分的 0.03%~0.6% 见血封喉的毒汁	静脉系闭塞疾病，潜在的致肝癌物	局部使用于未破损的皮肤是安全的
	石蚕属植物	百里香	在气生部分的石蚕苷	肝坏死	少量用于香料饮料是安全的
	千里光	林荫千里光	在气生部分的 0.01%~0.1% 见血封喉的毒汁	静脉系闭塞疾病，潜在的致肝癌物	
多器官毒性	山金车花	蒙大拿山金车花	花中的倍半萜烯内酯	高血压、心律不齐、肌肉瘫痪	局部使用可能安全
	秋水仙花	秋水仙	花和熟种子中 $\geq 0.4\%$ 的秋水仙碱	肾衰竭和骨髓障碍、肝脏毒性	成人致命剂量是 5g 种子
	棉花	棉籽	种子和根部的棉酚	心衰、精子生成抑制	食物中少量使用棉籽油是安全的
	黄水仙	水仙	鳞茎、叶和花中的石蒜碱	呼吸停止、局部刺激	
	半边莲属	北美山梗菜	叶子和种子中 6% 的山梗菜碱	低温、焦虑、发作、心律不齐、呼吸停止	使用 1g 有尼古丁样毒性作用；成人致命剂量为 4g
	盾叶鬼臼	盾叶鬼臼	根和树脂中 20% 的鬼臼毒素	共济失调、发作、精神病、昏迷、黏膜刺激、血性腹泻	成熟的果子没有毒性；依托泊苷是一种半合成衍生物
	槲寄生	阔叶槲寄生	叶子、浆果和树枝中 2% 的槲寄生毒肽	谵妄、发作、低血压和心脏停搏	作为寄生物生存于其他的树枝上
	有毒的斑点毒芹	毒芹	叶子、浆果和花中的毒芹碱	瞳孔放大、眩晕、呼吸停止	成人致命剂量为 30g 浆果或 100g 叶子
	美洲卫矛	紫黑色卫矛	根皮、种子和浆果中未知的毒性成分	强直阵挛发作、昏迷、低血压、心脏停搏	
	野黑樱桃	美洲稠李	叶子、种子和茎中的苦杏仁苷	头痛、肌肉痉挛、昏迷、呼吸停止	在胃肠道中转化成氰化物
	土荆芥属	土荆芥	种子、浆果和气生部分蒸馏出的油中 80% 土荆芥油精	眩晕、发作、呼吸停止、低血压、心脏停搏	加热时油可能会爆炸
	黄茉莉属	常绿钩吻根	根部的常绿钩吻根碱	眩晕、瞳孔放大、发作、心搏徐缓、肌肉痉挛和呼吸停止	成人致命剂量为 4mL 的提取物或 2~3g 的根

T

续表

有害作用	通用名	拉丁名	毒性成分	严重不良反应	注释
多器官毒性	育亨宾树	育亨宾	树皮中 6% 的育亨宾碱	眩晕、焦虑、震颤、 α -2 肾上腺素能阻滞伴高血压、心脏停搏	

很多不安全草药实际上通常是由于明显含有天仙子胺(含有少量东莨菪碱)而具有抗副交感神经生理作用。这包括颠茄、天茄子、天仙子、曼陀罗、曼德拉草。这些草药引起一个症状群通常认为是“极热、极嗜、极干、极红、极疯狂”。包括混乱、幻觉、激动、体温升高、高血压、心动过速、瞳孔散大、黏膜干燥、皮肤干燥/发红及恶心/呕吐。最后,呼吸停止、疾病突然发作和威胁生命的心律失常也会发生。

一种草药,毒扁豆(加拉巴豆)由于成熟种子含毒扁豆碱,实际上引起拟胆碱毒性(像杀虫剂过量)。这种毒性包括心搏徐缓和血压过低、潜在地引起心跳和呼吸停止。

几种草药明显含有强心甘,包括苏格兰金雀花、加拿大大麻、大蒜芥、铃兰、乌头、桂足香、毛地黄,从这些草药可以得到常规药物地高辛。这些草药能引起过缓性心律失常和心脏传导阻断。

其他潜在的不安全草药具有不同程度的神经毒性、胃肠道毒性和肝毒性,很多导致多器官毒性。马钱子种子和树皮中含有马钱子碱,泻药和蓖麻子能引起轻度腹泻;callamus、chaparal 和紫草科植物均为潜在致肝癌物^[54];科番红花属含秋水仙碱;山梗菜属具有烟碱样作用。所有这些草药应该避免,它们潜在的高毒性再次说明“天然”不总是意味着“安全”^[18,53,55,56]。

患者评估和咨询要点

当对想开始使用草药补充品的患者进行评估时,应该同时考虑到过去医疗史和目前同时使用的常规药物治疗以避免可能的相互作用。建议患者告知他们的药师所采取的所有的常规和其他药物治疗。应该告知患者草药可能有益或有害,以及有限的功效资料通常是通过一项对照的、科学的方法得到的。如果药学从业者感觉患者服用草药补充品是安全的,应该强调几个忠告以使优质的草药补充品的潜力最大化。一般应该避免服用多成分产品,除非患者有草药师的照顾。标签应该列出通用名、拉丁名以及生产商地址。最好购买著名的、遵守 GMP 的生产商生产的草药补充品。应告知患者,有不同的剂型,且并非所有草药作为片剂形式服用效果都最好。“全草”产品一般是陆生植物部分,且根本不标准,应该避免服用。当然,患者应该注意,不要相信补充品中所声称的每一个药效。最后,应该告知患者,及时报告任何一个他们认为可能由补充品引起的不良反应。

替代医疗资源

当然,出版的综述文章、临床试验和病例报告都能在中

Medline(联机医学文献分析和检索系统)中查到。为辅助药学从业者评价各种草药产品的潜在的安全性和有效性,以下是另外几种著名的医疗信息资源^[57,58]。

1. 书目

- 《美国癌症学会补充和替代癌症治疗方法指南》(美国癌症学会, 2000) (*The American Cancer Society's Guide to Complementary and Alternative Cancer Methods*) (American Cancer Society, 2000).
- 《植物安全手册》(*The Botanical Safety Handbook*) (McGuffin, CRC Press, 1997).
- 《草药的禁忌证和药物相互作用》(*Herb Contraindications and Drug Interactions*) (second edition, Brinker, Eclectic Medical Publications, 1998).
- 《草药: 临床指南》(*Herbal Medicinals: A Clinician's Guide*) (Miller & Murray, Haworth Press, 1998).
- 《草药: 扩大委员会 E 专论》(*Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*) (Blumenthal, Brinckmann, Goldberg, Integrative Medicine Communication, 2000).
- 《补充和替代医疗执业手册》(*The Professional's Handbook of Complementary and Alternative Medicine*) (Fetrow & Avila, Springhouse, 1999).
- 《合理的草药治疗: 医生草药指南》(*Rational Phytotherapy: A Physician's Guide to Herbal Medicine*) (fourth edition, Schulz, Springer-Verlag, 2001).
- 《Tyler's 选择草药: 草药在医疗上的应用》(*Tyler's Herbs of Choice: The Therapeutic Use of Phytomedicinals*) (second edition, Robbers & Tyler, Haworth Press, 1999).
- 《Tyler's 诚实草药: 合理使用草药和相关方法指南》(*Tyler's Honest Herbal: A Sensible Guide to the Use of Herbs and Related Remedies*) (fourth edition, Foster & Tyler, Haworth Press, 1999).

2. 期刊

- *Alternative Medicine Alert*.
- *Alternative Medicine Journal*.
- *HerbalGram* (American Botanical Council).
- *Journal of Alternative and Complementary Medicine*.
- *Journal of Natural Products* (American Society of Pharmacognosy).
- *Natural Medicines Comprehensive Database* (The Pharmacists' Letter).

• *The Review of Natural Products* (Facts and Comparisons).

3. 网页资源

- Alternative Medicine Foundation Herbal Medicine (<http://www.herbmed.org>).
- American Botanical Council (<http://www.herbalgram.org>).
- American Cancer Society's Alternative and Complementary Therapies.
- Herbal Research Foundation (<http://www.herbs.org>).
- HerbNet (<http://www.herbnet.com>).
- NAPRALERT at the University of Illinois at Chicago (<http://www.pmrmp.uic.edu>).
- National Cancer Institute PDQs on Alternative Cancer Therapies (<http://www.cancer.gov>).
- National Center for Complementary and Alternative Medicine (<http://nccam.nih.gov>).
- The Natural Pharmacist (<http://www.tnp.com/home.asp>).

结论

替代医疗的使用正在增长, 其中草药增长最快。草药具有与常规药物一样的有效性和安全性, 但在 1994 年的 DSHEA 法中作为饮食补充品销售。该法规的缺陷包括: 不标准的植物学术语、很少的 GMP 保证、FDA 安全性责任强于生产商, 以及缺乏有效的资料。但是, 危险的不良反应和草药-药物相互作用的报道频率在增加。当前的药学从业者没有接受正式的草药培训, 然而他们需要熟悉草药使用方法、剂量、毒性、禁忌证和潜在的与药物的相互作用, 这有助于患者安全地选择使用补充品。紫锥菊、大蒜、人参、银杏、金丝桃、麻黄和缬草是最常用的补充品, 但有很多其他补充品有潜在的有害作用。幸运的是, 除常规模期刊外, 还有许多著名的草药文章和杂志, 为药学从业者提供可靠的草药信息。

参考文献

1. Cassileth, B. R.; Chapman, C. C. Alternative and Complementary Cancer Therapies. *Cancer* 1996, 77 (6), 1026-1034.
2. <http://nccam.nih.gov/> (accessed February 2002).
3. Blumenthal, M.; Israelsen, L. D. The History of Herbs in the United States; Legal and Regulatory Perspectives. In *Herbal Medicinals: A Clinician's Guide*; Miller, L. G., Murray, W. J., Eds.; The Haworth Press; New York, 1998; 325-353.
4. Eisenberg, D. M.; Kessler, R. C.; Foster, C.; Norlock, F. E.; Calkins, D. R.; Delbanco, T. L. Unconventional Medicine in the United States. *N. Engl. J. Med.* 1993, 328 (4), 246-252.
5. Eisenberg, D. M.; Davis, R. B.; Ettner, S. L.; Appel, S.; Wilkey, S.; Van Rompey, M.; Kessler, R. C. Trends in Alternative Medicine Use in the United States, 1990-1997; Results of a Follow-Up National Survey. *J. Am. Med. Assoc.* 1998, 280 (18), 1569-1575.
6. Astin, J. A. Why Patients Use Alternative Medicine: Results of a National Study. *J. Am. Med. Assoc.* 1998, 279 (19), 1548-1553.
7. Paltiel, O.; Avitzour, M.; Peretz, T.; Cherny, N.; Kaduri, L.; Pfeffer, R. M.; Wagner, N.; Soskolne, V. Determinants of the Use of Complementary Therapies by Patients with Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2001, 19 (9), 2439-2448.
8. Ernst, E.; Bassileth, B. R. The Prevalence of Complementary/Alternative Medicine in Cancer: A Systemic Review. *Cancer* 1998, 83 (4), 777-782.
9. Richardson, M. A.; Sanders, T.; Palmer, J. L.; Greisinger, A.; Singletary, S. E. Complementary/Alternative Medicine Use in a Comprehensive Cancer Center and the Implications for Oncology. *J. Clin. Oncol.* 2000, 18 (13), 2505-2514.
10. Boon, H.; Stewart, M.; Kennard, M. A.; Gray, R.; Sawka, C.; Brown, J. B.; McWilliams, C.; Gavin, A.; Baron, R. A.; Aaron, D.; Haines-Kanka, T. Use of Complementary/Alternative Medicine by Breast Cancer Survivors in Ontario: Prevalence and Perceptions. *J. Clin. Oncol.* 2000, 18 (13), 2515-2521.
11. Fairfield, K. M.; Eisenberg, D. M.; Davis, R. B.; Libman, H.; Phillips, R. S. Patterns of Use, Expenditures, and Perceived Efficacy of Complementary and Alternative Therapies in HIV-Infected Patients. *Arch. Intern. Med.* 1998, 158, 2257-2264.
12. Lenz, K. L. Developing a Pharmacy Curriculum in Complementary and Alternative Medicine. *J. Pharm. Pract.* 1999, 12 (3), 178-186.
13. Chang, Z. G.; Kennedy, D. T.; Holdford, D. A.; Small, R. E. Pharmacists' Knowledge and Attitudes Toward Herbal Medicine. *Ann. Pharmacother.* 2000, 34, 710-715.
14. Robbers, J. E.; Tyler, V. E. *Tyler's Herbs of Choice: The Therapeutic Use of Phytomedicinals*, 2nd Ed.; The Haworth Press; New York, 1999.
15. Gurley, B. J.; Gardner, S. F.; Hubbard, M. A. Content Versus Label Claims in Ephedra-Containing Dietary Supplements. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 2000, 57, 963-969.
16. <http://www.fda.gov/medwatch> (accessed February 2002).
17. DiPaola, R. S.; Zhang, H.; Lambert, G. H.; Meekr, R.; Licitra, E.; Rafi, M. M.; Zhu, B. T.; Spaulding, H.;

T

- Goodin, S.; Toledano, M. B.; Hait, W. N.; Gallo, M. A. Clinical and Biologic Activity of an Estrogenic Herbal Combination (PC-SPES) in Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* 1998, 339 (12), 785—791.
18. Fetrow, C. W.; Avila, J. R. *Professional's Handbook of Complementary and Alternative Medicines*; Springhouse: Springhouse, PA, 1999.
19. Miller, L. G. Herbal Medicinals; Selected Clinical Considerations Focusing on Known or Potential Drug-Herb Interactions. *Arch. Intern. Med.* 1998, 158, 2200—2211.
20. Vaes, L. P. J.; Chyka, P. A. Interactions of Warfarin with Garlic, Ginger, Ginkgo, or Ginseng: Nature of the Evidence. *Ann. Pharmacother.* 2000, 34 (12), 1478—1482.
21. Heck, A. M.; DeWitt, B. A.; Lukes, A. L. Potential Interactions Between Alternative Therapies and Warfarin. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 2000, 57, 1221—1230.
22. Fugh-Berman, A. Herb-drug Interactions. *Lancet* 2000, 355, 134—138.
23. Pepping, J. Black Cohosh; *Cimicifuga racemosa*. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 1999, 56, 1400—1402.
24. Jacobson, J. S.; Troxel, A. B.; Evans, J.; Klaus, L.; Vahdat, L.; Kinne, D.; Steve Lo, K. M.; Moore, A.; Rosenman, P. J.; Kaufman, E. L.; Neugut, A. I.; Grann, V. R. Randomized Trial of Black Cohosh for the Treatment of Hot Flashes Among Women with a History of Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2001, 19 (10), 2739—2745.
25. Pepping, J. DHEA; Dehydroepiandrosterone. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 2000, 57, 2048—2056.
26. Pepping, J. Echinacea. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 1999, 56, 121—122.
27. Giles, J. T.; Palat, C. T.; Chien, S. H.; Chang, Z. G.; Kennedy, D. T. Evaluation of Echinacea for Treatment of the Common Cold. *Pharmacotherapy.* 2000, 20 (6), 690—697.
28. Gallo, M.; Sarkar, M.; Au, W.; Pietrzak, K.; Comas, B.; Smith, M.; Jaeger, T. V.; Einarson, A.; Koren, G. Pregnancy Outcome Following Gestational Exposure to Echinacea; A Prospective Controlled Study. *Arch. Intern. Med.* 2000, 160, 3141—3143.
29. Stevinson, C.; Pittler, M. H.; Ernst, E. Garlic for Treating Hypercholesterolemia; A Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *Ann. Intern. Med.* 2000, 133 (6), 420—429.
30. Ackermann, R. T.; Mulrow, C. D.; Ramirez, G.; Gardner, C. D.; Morbidoni, L.; Lawrence, V. A. Garlic Shows Promise for Improving Some Cardiovascular Risk Factors. *Arch. Intern. Med.* 2001, 161, 813—824.
31. Grant, K. L.; Lutz, R. B. Ginger. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 2000, 57, 945—947.
32. Vutyavanich, T.; Kraissarin, T.; Ruangsri, R. A. Ginger for Nausea and Vomiting in Pregnancy: Randomized Double-Masked, Placebo-Controlled Trial. *Obstet. Gynecol.* 2001, 97 (4), 577—582.
33. Le Bars, P. L.; Katz, M. M.; Berman, N.; Itil, T. M.; Freedman, A. M.; Schatzberg, A. F. A Placebo-Controlled, Double-Blind, Randomized Trial of an Extract of Ginkgo Biloba for Dementia. *J. Am. Med. Assoc.* 1997, 278 (16), 1327—1332.
34. Pittler, M. H.; Ernst, E. Ginkgo Biloba Extract for the Treatment of Intermittent Claudication; A Meta-analysis of Randomized Trials. *Am. J. Med.* 2000, 108 (3), 276—281.
35. Fessenden, J. M.; Wittenborn, W.; Clarke, L. Ginkgo Biloba: A Case Report of Herbal Medicine and Bleeding Postoperatively from a Laparoscopic Cholecystectomy. *Am. Surgeon* 2001, 67 (1), 33—35.
36. Cardinal, B. J.; Engels, H. J. Ginseng Does Not Enhance Psychological Well-being in Healthy Young Adults: Results of a Double-Blind, Placebo-Controlled Randomized Clinical Trial. *J. Am. Diet. Assoc.* 2001, 101 (6), 655—660.
37. Runkel, D. R.; Cupp, M. J. Glucosamine Sulfate Use in Osteoarthritis. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 1999, 56, 267—269.
38. McAlindon, T. E.; LaValley, M. P.; Gulin, J. P.; Felson, D. T. Glucosamine and Chondroitin for Treatment of Osteoarthritis; A Systemic Quality Assessment and Meta-analysis. *J. Am. Med. Assoc.* 2000, 283 (11), 1469—1475.
39. Pisters, K. M. W.; Newman, R. A.; Coldman, B.; Shin, D. M.; Khuri, F. R.; Hong, W. K.; Glisson, B. S.; Lee, J. S.; Phase I Trial of Oral Green Tea Extract in Adult Patients with Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* 2001, 19 (6), 1830—1838.
40. Taylor, J. R.; Wilt, V. M. Probable Antagonism of Warfarin by Green Tea. *Ann. Pharmacother.* 1999, 33, 426—428.
41. Almeida, J. C.; Grimsley, E. W. Coma from the Health Food Store; Interaction Between Kava and Alprazolam. *Ann. Intern. Med.* 1996, 125, 940—941.
42. Haller, C. A.; Benowitz, N. L. Adverse Cardiovascular and Central Nervous System Events Associated with Dietary Supplements Containing Ephedra Alkaloids. *N. Engl. J. Med.* 2000, 343 (25), 1833—1838.
43. Pepping, J. Melatonin. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 1999, 56, 2520—2527.
44. Pepping, J. Milk Thistle; *Silybum marianum*. *Am. J.*

- Health-Syst. Pharm. 1999, 56, 1195—1197.
45. Chavez, M. SAME: S-Adenosylmethionine. Am. J. Health-Syst. Pharm. 2000, 57, 119—123.
 46. Wilt, T. J.; Ishani, A.; Stark, G.; MacDonald, R.; Lau, J.; Mulrow, C. Saw Palmetto Extracts for Treatment of Benign Prostatic Hypertrophy: A Systemic Review. J. Am. Med. Assoc. 1998, 280 (18), 1604—1609.
 47. Shelton, R. C.; Keller, M. B.; Gelenberg, A.; Dunner, D. L.; Hirschfeld, R.; Thase, M. E.; Russell, J.; Lydiard, R. B.; Crits-Cristoph, P.; Gallop, R.; Todd, L.; Hellerstein, D.; Goodnick, P.; Keitner, G.; Stahl, S. M.; Halbrich, U. Effectiveness of St. John's Wort in Major Depression: A Randomized Clinical Trial. J. Am. Med. Assoc. 2001, 285 (15), 1978—1986.
 48. Gaster, B.; Holroyd, J. St. John's Wort for Depression: A Systemic Review. Arch. Intern. Med. 2000, 160, 152—156.
 49. Barone, G. W.; Gurley, B. J.; Ketel, B. L.; Lightfoot, M. L.; Abul-Ezz, S. R. Drug Interactions Between St. John's Wort and Cytosporine. Ann. Pharmacother. 2000, 34, 1013—1016.
 50. Ruschitzka, F.; Meier, P. J.; Turina, M.; Luscher, T. F.; Noll, G. Acute Heart Transplant Rejection Due to Saint John's Wort. Lancet 2000, 355, 548—549.
 51. Piscitelli, S. C.; Burstein, A. H.; Chaitt, D.; Alfaro, R. M.; Falloon, J. Indinavir Concentrations and St. John's Wort. Lancet 2000, 355, 547—548.
 52. Plushner, S. L. Valerian; Valeriana officinalis. Am. J. Health-Syst. Pharm. 2000, 57, 328—335.
 53. Vanderhoff, B. T.; Mosser, K. H. Jimson Weed Toxicity: Management of Anticholinergic Plant Ingestion. Am. Fam. Physician 1992, 46 (2), 526—530.
 54. Sheikh, N. M.; Philen, R. M.; Love, L. A. Chaparral-Associated Hepatotoxicity. Arch. Intern. Med. 1997, 157, 913—919.
 55. Weisbord, S. D.; Soule, J. B.; Kimmel, P. L. Poison Online: Acute Renal Failure Caused by Oil of Wormwood Purchased Through the Internet. N. Engl. J. Med. 1997, 337 (12), 825—827.
 56. Tai, Y. T.; But, P. P. H.; Young, K.; Lau, C. P. Cardiotoxicity After Accidental Herb-Induced Aconite Poisoning. Lancet 1992, 340, 1254—1256.
 57. Kiefer, D.; Shah, S.; Gardiner, P.; Wechkin, H. Finding information on Herbal Therapy: A Guide to Useful Sources for Clinicians. Altern. Ther. 2001, 7 (6), 74—78.
 58. Eisenberg, D. M. Advising Patients Who Seek Alternative Medical Therapies. Ann. Intern. Med. 1997, 127 (1), 61—69.

(杜敏琼 译)



T

统计过程控制和工序能力

Thomas D. Murphy

Consultant, Morristown, New Jersey, U. S. A.

Shailesh K. Singh

Merlin L. Utter

Wyeth, Pearl River, New York, U. S. A.

引言

1. 范围

统计过程控制 (statistical process control, SPC) 作为一种统计手段, 可用于评估工序和通过消除工序干扰因素改善这些工序的质量。当在一个公司内成功实施 SPC 后, 由于降低了生产成本、提高了质量、减少了麻烦和增进了与客户的关系, 最终获得了利益回报。工序能力 (process capability) 是一个与 SPC 相关的工具, 当统计控制成功实施后, 工序能力用于评估工序能够生产出合格产品的实际能力。同时, 工序能力可被用于确定在规定的产品规格范围内, 该工序是否可以继续实施。

这些工具已被成功地用于汽车和半导体等行业, 而且卓有成效地帮助这些公司改善了产品质量。虽然这些工具只被小部分制药行业运用, 但是他们在改善产品质量方面显示出了巨大潜力。本章的目的就在于解释这些概念并对于在实际操作中如何实施进行阐述。文中将讨论这些概念性工具与制药行业的正确关系和应用中应注意的问题。为了更好的理解, 文中也提供了一定量的实例。同时, 我们也将章中讨论为什么制药行业对这些概念接受缓慢。

2. 基本原则

工序在此被定义为使投入变为产出的一系列相关的或互相影响的活动。统计过程控制指可实现提高产品质量的一系列技术。虽然大家首先想到了生产过程, 实际上, SPC 可被应用于任何过程, 如产品服务、办公程序和质量保证等。工序能力分析评估工序达到规范要求的能力。

在所有工序中, 不论其被设计和维护得如何成功, 总有一些先天的或固有的可变因素存在。这些固有的可变因素被称作稳定系统的偶然因素。工序若只存在这些偶然因素, 则称该工序处在统计控制下。统计工序控制通过对一个或多个工序或产品特性的研究来评定该工序是否处于统计控制。

如果在工序中出现了问题, 将需着手调查并确定引起该问题的干扰因素所在。接下来, 该干扰因素将通过工序调整消除或处于可控状态。因为干扰因素被消除或被控制, 所以实现了改进工序的目的。固有因素分析 (root cause analysis) 是一个结构研究, 其目标在于确定干扰因素, 同时寻求消除

该因素的方法。这个过程中卷入了诸如流程图分析、头脑风暴讨论、因果图和 Pareto 分析等工具的应用^[1,2]。

控制图 (control chart) 是 SPC 的基本分析工具, 最初用于评估工序, 随之在兼顾目标控制和工序可变性的同时, 用于监控该工序的产品。控制图是按时间顺序描述的相关变量的统计量图形。这个变量可能是工序变量, 如温度或流速, 也可能是产品变量, 如填充质量或药效。统计描述的可以是个体样本的测定值、多个样本测定的均值、不合格样品的百分率、一定时间或空间内的过失出现数或者多次测定引起的极差区间或标准差等的测定值。

在控制图上, 同时要标出上下控制限。通常该控制限距统计表上的中线或平均值 ± 3 倍标准误差 (SE)。这样就可最低水平 (如统计量服从正态分布的话, 该水平为 3%) 上控制发生假警报的风险。当控制图上所有的点都随机地出现在控制范围内的时候, 该工序即被认为在统计控制状态。中线和控制限可通过计算工序相关数据得出。

统计工序控制

1. Shewhart 图

当数据为大量的数字变量且每个时间点有大量的数据时, 可应用 Shewhart 表。对于不连续的工序, 在每个时间点将有很多抽样, 而又会测定多方面特征, 因此会获得大量数据。这些数据可分为多个亚组。 n 则代表亚组的数量。而一个亚组内所包含的多个值分别被命名为 X_1, X_2, \dots, X_n 。这个亚组的平均值是通过 $\bar{X} = \sum_{i=1}^n X_i / n$ 计算出来的, 并在均值图 (又称 \bar{X} 图) 上作为该时间点测出的工序均值标出。该亚组的范围可通过 $R = \text{Max}(X_i) - \text{Min}(X_i)$ 求得, 并在极差图 (又称 R 表) 中作为该时间点测得的工序变异标出。这两张表合起来即为 Shewhart 表。

在每张表中, 一条实线用来代表平均值, 称作中线 (central line, CL)。在 \bar{X} 图中, CL 为所有均值的均值, 即 $\bar{\bar{X}} = \sum_{j=1}^k \bar{X}_j / k$ 。对于 R 表, CL 即为所有极差的均值, 即 $\bar{R} = \sum_{j=1}^k R_j / k$, k 代表亚组的数量。

在 CL 两侧设置统计量的 ± 3 倍标准误差作为控制限。如果统计值落在控制限的外侧, 则说明该工序不在统计控制状态。由于标准误差具有反映工序标准差 (σ) 的作用, 因此对

该值的评估是很有必要的。标准误差可从平均范围求出。控制下限 (LCL) 和控制上限 (UCL) 可通过表 1 所示求得。

表 1 LCL 和 UCL 的求法

图	CL	LCL	UCL
均值图	\bar{X}	$\bar{X} - A_2 \bar{R}$	$\bar{X} + A_2 \bar{R}$
极差图	\bar{R}	$D_3 \bar{R}$	$D_4 \bar{R}$

表 1 中 A_2 , D_3 和 D_4 的值在表 2 中给出。

表 2 控制图相关因子

n	A_2	D_3	D_4	d_2
2	1.880	0	3.267	1.128
3	1.023	0	2.575	1.693
4	0.729	0	2.282	2.059
5	0.577	0	2.114	2.326
6	0.483	0	2.004	2.534
7	0.419	0.076	1.924	2.704
8	0.373	0.136	1.864	2.847
9	0.337	0.184	1.816	2.970
10	0.308	0.223	1.777	3.078

d_2 用于计算工序标准差 $\sigma = \bar{R}/d_2$, 符号 “-” 表示该数值为估计值。相关文献[3]提供了大样本量的控制变

量表。

2. Shewhart 表的范例

下面是一个关于药粉填充的假设工序。每小时抽取 5 个样品考察其填充量。图 1 显示了相关的 Shewhart 图。均值图暗示 3, 4, 9, 14 和 17 亚组不在统计控制内。对均值图的进一步研究发现, 12 亚组的工序均数出现了一个可能的偏移, 极差图显示 6 亚组工序的离散波动增大。随之的原因调查确证 12 亚组的变化源于新的填药漏斗, 该漏斗所填充药粉的密度较以前要大 (药物的填充通过体积控制)。由于药物填充量的增加引起生产线在 6 亚组前中断, 这增加了启动时填充量的可变性。

SPC 的目的就是发现引起问题的因素并消除这些因素。在这个例子里, 两个问题因素被揭示: 填充药粉密度的改变和不必要的生产线中断。

3. Shewhart 表计算

这一节旨在说明如何进行上述例子中控制图数据的计算。在本例中, 控制限可从相关生产线数据计算得出。在 SPC 的后段中, 该控制限将用于从工序中进一步得出的数据。以上数据每个亚组计算得到的平均值和极差见表 3。

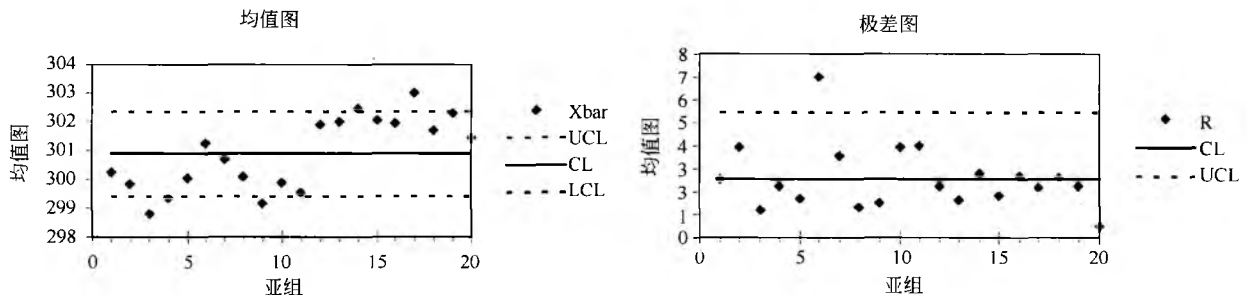


图 1 假设的药粉填充的 Shewhart 控制图

表 3 药粉填充的抽样数值及其均值与极差

亚组	数据					均值	极差
1	299.7	298.7	300.2	301.3	301.2	300.2	2.6
2	301.7	297.8	299.8	301.1	298.9	299.9	3.9
3	299.3	298.3	298.2	299.0	299.2	298.8	1.2
4	297.9	299.4	299.6	300.1	299.6	299.3	2.3
5	299.7	299.6	301.3	299.9	299.8	300.1	1.7
6	299.5	302.0	300.9	302.4	299.3	301.2	7.0
7	301.7	298.4	300.5	300.9	301.9	300.7	3.5
8	299.9	299.5	300.7	299.6	300.8	300.1	1.3
9	298.6	299.2	298.5	299.6	300.0	299.2	1.5
10	300.0	299.7	302.2	298.3	299.3	299.9	3.9

续表

亚组	数据					均值	极差
11	297.4	301.4	298.7	299.3	300.8	299.5	4.0
12	300.5	300.9	300.6	298.6	298.9	301.9	2.2
13	300.7	300.3	299.1	299.8	300.1	302.0	1.6
14	300.6	300.1	299.1	301.9	300.5	302.4	2.8
15	300.1	300.8	300.9	299.4	299.1	302.0	1.8
16	301.1	298.8	298.4	300.7	300.6	301.9	2.7
17	302.2	301.4	301.3	300.1	300.0	303.0	2.2
18	300.5	300.0	298.9	298.2	300.8	301.7	2.6
19	300.4	300.6	300.2	299.0	301.2	302.3	2.3
20	299.7	299.2	299.2	299.6	299.5	301.4	0.5
亚组总和						6017.6	51.6
亚组均值						300.9	2.6

表3是各亚组均值和极差的计算结果。总体均值和均值极差通过式 $\bar{\bar{X}} = \sum_{i=1}^k \bar{X}_i / k = 6017.6 / 20 = 300.9$ 和 $\bar{R} = \sum_{i=1}^k R_i / k = 51.6 / 20 = 2.6$ 计算得出 ($k=20$)。相应的数值作为中线分别被标于均值图和极差图中。

对于一个有5个亚组的工序,由表2可知其 n , A_2 , D_3 , D_4 和 d_2 分别为5, 0.577, 0, 2.114, 2.326。均值图的控制限为

$$LCL = \bar{\bar{X}} - A_2 \bar{R} = 300.9 - (0.577)(2.6) = 299.4$$

$$UCL = \bar{\bar{X}} + A_2 \bar{R} = 300.9 + (0.577)(2.6) = 302.4$$

极差图的控制限为

$$LCL = D_3 \bar{R} = (0)(2.6) = 0$$

$$UCL = D_4 \bar{R} = (2.114)(2.6) = 5.5$$

该工序估计的标准差为

$$\hat{\sigma} = \bar{R} / d_2 = 2.6 / 2.326 = 1.1$$

4. 控制图的设计

Shewhart方法的一个基本原则是:在把观测值分组时,尽量使组间变异最大化而组内变异最小化。例如:如果我们从填充流水线上每小时取4瓶样品的话,那么在同一时间点同时取样要比每隔15min取一次好得多。较长时间内的抽样更容易得出固有变异外的其他变异。

而抽样的频率则取决于工序的动态变化。也就是说,它依赖于工序对自身输入端变化所作出反应的速率和由于回应不及时所导致的后果^[4]。另一个考虑的因素是测试的反馈时间,因为如果所测得的数据在下次采样前没有得到应用的话,高的采样频率其实是没有什么用的。显而易见,外观检测结果可以适时得出而化学监测则要求实验室分析。

另外亚组的大小则是以如下这些考虑为基础的,如采样的费用和难易、监测的费用和难易及对一定量的结果需快速发现变化的要求。对于外观监测,通常分为4~5个亚组,因为这样可以确保如果个体分布适度对称的话,均值

处于正常分布。如果检测的周期较长或费用较为昂贵时,亚组数量通常减为2~3个。大的亚组数,如10或20,较为少用,仅推荐用于控制图对微小的变化极为敏感、检测快速且费用低廉的情况。

表4显示了均值图当亚组数 n 变化时,亚组的均数和平均运行时间(ARL)对时间标准差的变化作出反应的速率^[1]。亚组的数量越大,对于变化越为敏感。

表4 $h\sigma$ 与亚组数变异的平均时间

平均 时间/h	亚组数 (n)					
	1	2	4	6	10	16
0.5	167.3	92.4	44.0	26.4	12.8	6.3
0.6	124.4	63.9	27.8	15.9	7.4	3.6
0.8	72.3	32.4	12.4	6.7	3.1	1.7
1.0	44.0	17.7	6.3	3.4	1.8	1.2
1.2	27.8	10.4	3.6	2.1	1.3	1.0
1.4	18.3	6.5	2.4	1.5	1.1	1.0
1.6	12.4	4.3	1.7	1.2	1.0	1.0
1.8	8.7	3.1	1.4	1.1	1.0	1.0
2.0	6.3	2.3	1.2	1.0	1.0	1.0
2.5	3.2	1.4	1.0	1.0	1.0	1.0
3.0	2.0	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0

5. 缺乏统计控制情况下的SPC的补充规则

如果测定值在控制限内且随机分布,那么该工序处于统计控制之下。为了发现干扰因素,《统计质量控制手册》一书提供了一系列的补充规则^[5],下面就是这些规则的部分内容。当3点中的2点落于警戒线外、连续8点高于或低于CL、连续6点持续上升或下降、连续14点交替上下

等情况出现时,被认为该工序超出控制。

为了有效实施这些原则,在控制图内除了控制限外,标出警戒限($\pm 2SE$)同样重要。这些规则的运用需要一定的判断力,研究发现在应用这些规则后,假警报信号出现率要比单纯运用 $\pm 3SE$ 作为控制限要高^[6]。

6. 多工序的控制图

许多工序由很多小的分支组成,如多头的填充器和用于压片的多孔模具。每个分支都应被当作一个独立的工序^[7]。这有以下两种情形:

- (1) 在监控产品时,分支数量可被独立确定;
- (2) 分支数量不能确定。

对于第(1)种情况,主张总体的控制图在每个分支上进行但是只需在图上标出出现极值的两个分支即可。每个单独的分支将标出相关的极限,相应的一些规则将不再适用。如果各个填充头的分装量紧密相关,那么某一分支的控制图可代替整体的控制图。

多头高速填充则属第(2)种情况,这种情况下,每个时段可随机抽取任何一个填充头的样品。每改变一次填充量(如有必要改变多次),从所有的填充头(即进行填充头检查)得到一整套数据。该数据可用于各个填充头的调节。

在多工序中有两种类型的干扰因素:一种只影响其中的一个填充头(例如堵塞),另一种则影响所有的填充头(例如黏滞)。填充头的检测可以确定是否为第一种因素影响,而随机抽样的控制图则可确定是否为第二种因素影响。填充头和填充头之间的变异被认为是另一种干扰因素,但是该因素不能被完全消除。

7. 其他控制图

标准差图可代替极差图(R 表),样本的标准差 s 可通过 $s = \sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 / (n-1)}$ 计算得出。统计上认为标准差 s 要比极差 R 更为有用,因为 s 要考虑亚组中所有的数据而 R 只需考察两个极值。但是极差图更容易在车间中应用,因此推荐在亚组数超过7时应用极差图,这时极差图的有效性应至少达到标准差图的90%以上。标准差图的相关因子可在文献[3]中查到。

个体动态极差图(individual-moving range chart)适用于只有一个亚组的情况。如果工序涉及同一批次或连续工序的大量样品,只有单次检测有实际意义,因为多次检测只是反映了检测和抽样的变异而不是工序变异。因为单次测定就没有所谓的检测变异存在,可以算出动态极差或两次连续测定的绝对差异。均值的动态极差所起的作用和Shewhart图中均值极差的作用相同。个体动态极差图的控制限通过 $A_2 = 2.66$ 计算。动态极差图中的UCL通过 $D_4 = 3.267$ 计算得出。

另外两个可替代Shewhart表的是累计总和(cumulative sum)控制图和指数权重均数表(exponentially weighted moving average, EWMA)控制图,这二者计算复杂但

是却能有限地发现微小的变化。在参考文献[1, 2]中有详细描述,在此就不再赘述。

当统计数值为药品不合格率时,可应用 P 表。当统计描述在一定时间或范围内,某缺陷检出或某时间的发生数量时,可应用 C 表。这些表被定义为品质表,在文献[1, 2]中已有详尽描述。

8. 建立和维持统计过程控制

当SPC在一个工序中应用后,该工序产品质量稳定,则该SPC程序是有一定价值的。当一个团队(包括操作人员、一线的监督、技术支持和公司经理)最初建立时,是实施SPC的最佳时机。这个团队必须明确什么是需要检测的最为重要的可变因素,而且这些变量必须控制在最小值。

Ryan^[2]讨论了关于控制图用途的三个阶段:

阶段1——对工序进行评估而对历史数据进行回顾性分析;

阶段2——对工序进行实时监控,发现并解决特别问题;

阶段3——工序监控以确认工序处于统计学控制。

在阶段1,如果没有数据提供,那么第1步就是收集和整理数据。这些数据表应保存在操作区且通常为手工绘制。应鼓励操作者记录工序调整及所有可能的事件,这些图表属于操作记录的一部分。在控制图中画出控制限前最少应收集100个数据点^[2]。因为大多数亚组的量是4~5个,因此这个量相当于每个亚组20~25个数据点。起始所有的数据按流程表排列,标出均值。这个团队应集中讨论可能会影响工序变量的干扰因素。

在阶段2,整个团队应对脱离控制的信号作出及时反应并研究相关干扰因素。这个阶段,整个团队需要记录任何与确定相关变量有关的信息。当在相当长的一段时间内,少有(100~300个亚组中1个)警报信号出现时,被认为工序处于控制,该阶段结束。如果工序进行了调整,那么控制限也应按一定的频率进行重新计算,如每50个亚组一次或一年一次,这取决于观测的频率。

在阶段3,监控工序是为了避免问题因素的出现。当一定的问题因素不能完全消除时,操作人员应制定一套超出控制的行动计划(out-of-control action plan, OCAP)备用^[2]。OCAP包括三个特征点:激活点、监测点和终结点。激活点指出现相关信号暗示OCAP必须被实施的情形,控制图通常可实现这个任务。监测点可告知操作者检测可能与出现的问题相关的特定部件。一旦确定了相关的干扰因素,终结点就须实施以解决该问题。

SPC的作用就是减少可变因素,提高工序制造的产品质量。由于降低了生产成本、提高了质量、减少了因麻烦导致的危机和增进了与客户的关系,最终获得了利益回报。从准确意义上来讲,SPC是一个使工序实现统计学控制的工具,而不是进行工序调整的工具。如要进行工序调整,在控制图上数据不断积累的过程中,中线通常设定在目标值,而且需要有目标调整计划。如果没有计划,操作人员



往往会调整过量。文献 [4] 详细讨论了此类人工工序调整。文献 [8, 9] 是两篇关于此主题的概述性文章。

工序能力

1. 确定工序性能指数

如前所述, 工序能力分析是与评估产品规格有关的工序性能。规格限度用 LSL 和 USL 表示, LSL 是指规格界限的下限, USL 是指规格界限的上限。在一些情况中, 只有一种规格界限: 上限或是下限。

下面是两个与工序能力相关的指数:

(1) 工序中央指数 (process-centered index), $C_P = (USL - LSL) / 6\sigma_c$

(2) 工序位移指数 (process-shifted index) $C_{PK} = \min[(USL - \mu) / 3\sigma_c, (\mu - LSL) / 3\sigma_c]$

这里, μ 表示工序均值; σ_c 表示测定的工序固有变量的标准差。指数 C_P 只能应用于有两侧规格限的情况。这些指数越高越好。

图 2~图 4 用于阐明 C_P 指数的意义, 包括 $C_P < 1$, $C_P = 1$ 和 $C_P > 1$ 的情况。

$C_P < 1$: 这个工序的 $\mu \pm 3\sigma_c$ 范围分布比规格限要宽 (图 2)。当工序处于控制的中间状态时, 就大量减少了次品的产量。超过规格限的曲线下面积用于描述次品, 这就说明工序不可能完全生产出符合规范的产品。

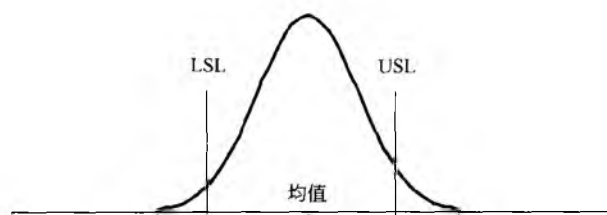


图 2 工序产品对规格, $C_P < 1$

$C_P = 1$: 这个工序的 $\mu \pm 3\sigma_c$ 范围分布正好和规格限一致 (图 3)。假定工序控制处于中间状态、工序输出产品处于正态分布时, 次品率为 0.27%。

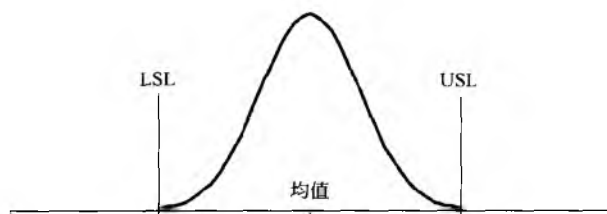


图 3 工序产品对规格, $C_P = 1$

$C_P > 1$: 这个工序的 $\mu \pm 3\sigma_c$ 范围分布比规格限要窄很多 (图 4)。工序的变异很小且无次品。

如果工序并非处于中间状态, 那么用 C_{PK} 作为工序能力指数则更为有意义。如图 5 所示。

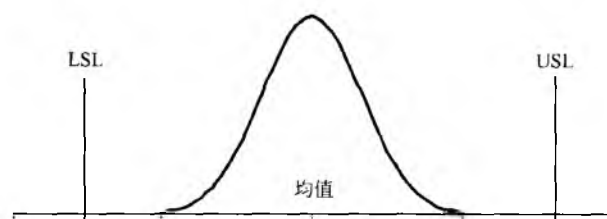


图 4 工序产品对规格, $C_P > 1$

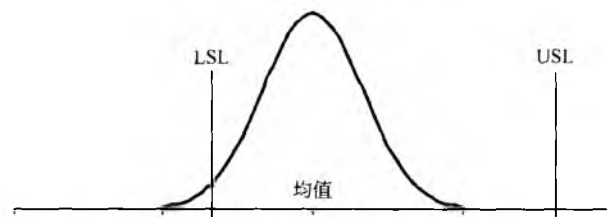


图 5 工序产品对规格, $C_{PK} < 1$

$C_{PK} < 1$: 对于此工序, $C_P > 1$, 但是工序并非处于中间状态, 因此次品就出现了。鉴于此种原因, $C_{PK} < 1$ 就能更好地反映此类情况 (图 5 所示)。 C_{PK} 定义为: $C_{PK} = |\mu - \text{最近的规格界限}| / 3\sigma_c$, 可有助于对其的理解。

C_P 和次品率之间的关系 (假定为正态分布) 在表 5 中给出。

表 5 C_P 和次品率之间的关系

C_P	次品率/%	C_P	次品率/%
0.6	7.19	1.0	0.27
0.7	3.57	1.1	0.097
0.8	1.64	1.2	0.032
0.9	0.69	1.3	0.001

一个工序只有处于近统计控制的状态下, 描述工序能力的指数才会有意义。理想的统计控制状态是很难实现的, 判断近统计控制状态的标准是超出控制的信号为每 100~300 个亚组中 1 次。这通常就是 SPC 阶段 3 的事情。只有达到这一点, 工序能力指数才能反映工序潜能。文献 [10, 11] 中阐述了许多关于应用工序能力指数的注意事项。

2. 工序实现指数

有时需要对并非处于严格的统计控制状态进行工序能力考察。在这种情况下, 工序实现指数就比较适用。工序实现指数的定义为: $P_p = (USL - LSL) / 6\sigma_p$, $P_{PK} = \min[(USL - \mu) / 3\sigma_p, (\mu - LSL) / 3\sigma_p]$, σ_p 指的是所有工序产品特征值的标准差。

对于并非处于严格意义上统计控制的工序而言, σ_p 大于 σ_c , 这是因为有由工序漂移而引出的额外变异。附加变异因素是 σ_s , 这里 “S” 用 σ_s 表示, 是特殊原因引起的变异。由于方差 (而非标准差) 是可加和的, 因此 $\sigma_p^2 = \sigma_c^2 + \sigma_s^2$ 。可以说, 使 σ_s 尽可能接近 0 是 SPC 的目的。判断工

序是否为统计控制的另一个准则是 σ_P/σ_C 是否接近 1。表 6 显示了该比值和特定变异因素在总体因素中所占的比例关系。

表 6 σ_P/σ_C 比值和特定变异因素在总体因素中所占的比例关系

σ_P/σ_C	$\sigma_P^2/\sigma_C^2/\%$
1.30	41
1.25	36
1.20	31
1.15	24
1.10	17
1.05	9
1.00	0

例如当 $\sigma_P/\sigma_C = 1.2$ 时, 特定变异因素所占的比例为 31%。这就可表示达到一个近统计控制状态。

3. 预测工序能力指数

为了从数据中预测工序能力指数, 下面公式中的预测值代替了工序实际值。

工序中间指数 $\hat{C}_P = (USL - LSL)/6\hat{\sigma}_C$

工序位移指数 $\hat{C}_{PK} = \min[(USL - \bar{X})/3\hat{\sigma}_C, (\bar{X} - LSL)/3\hat{\sigma}_C]$

其中, \bar{X} 代表预测的工序均值, $\hat{\sigma}_C$ 是固有工序变异标准差的预测值, \bar{X} 和 $\hat{\sigma}_C$ 的预测值可从初始的控制图分析求出, 其中 $\hat{\sigma}_C = \bar{R}/d_2$ 。

\hat{C}_P 预测值的应用前提是工序处于一个有两侧规格极值的规格限的中间, 这代表处于最佳的工序能力状态。 \hat{C}_{PK} 预测值评估未被假定处于中间状态的工序, 该值通常等于或小于 \hat{C}_P 。如果产品的分布近似正态分布且工序能力指数建立在大量数据基础上, 就可得出可接受的结果。有些工厂确定 $\hat{C}_P = 1$ 为无工序能力, $\hat{C}_{PK} = 1.33$ 或更高为有工序能力 (在此 $\hat{C}_{PK} = 1$ 代表工序处于中间状态且规格限范围为 $6\hat{\sigma}_C$)。

4. 预测工序实现指数

实现指数预测值的定义和能力指数的定义类似: $\hat{P}_P = (USL - LSL)/6\hat{\sigma}_P$ 和 $\hat{P}_{PK} = \min[(USL - \bar{X})/3\hat{\sigma}_P, (\bar{X} - LSL)/3\hat{\sigma}_P]$, $\hat{\sigma}_P$ 是所有工序产品相关特性数据的标准差。 $\hat{\sigma}_P$ 即预测的 σ_P , 不仅包括固有方差的预测值 $\hat{\sigma}_C$, 而且也包括由特定源于变异因素工序漂移所致的预测方差。因此对于非统计控制的工序而言, $\hat{\sigma}_P > \hat{\sigma}_C$ 。

如果工序不在严格意义的统计控制状态, 在实际操作中应尽一切可能使该工序处于近统计控制状态。如果工序不能实现统计学控制, 那么就应当收集足够的时间点数据,

使得有能力评估全部工序漂移且能确定这些数据是否能预示所有工序漂移。Pruett 和 Schneider^[12] 指出, P_{PK} 是一段时间内工序能力的考察指数。如果能得到足够的数, 就能通过预测值 \hat{P}_{PK} 评估工序满足产品质量要求的能力。如果数据不充分, \hat{P}_{PK} 就只能预示这些数据满足规格要求的能力。

在引起质量问题的干扰因素未被完全确定和控制之前, \hat{P}_{PK} 可预测消费者目前经历的工序完成状态, \hat{C}_{PK} 预测当工序不断接近统计控制状态时, 可达到的潜在工序能力。当工序达到统计控制状态时, \hat{P}_{PK} 和 \hat{C}_{PK} 接近。同样道理, 在工序无偏, 双向公差的情况下, \hat{P}_P 和 \hat{C}_P 被用于反映工序的能力如何。

5. 工序能力指数和性能指数预测值的精密度

需要记住的是, 不论是由数据计算出的能力指数或是性能指数, 它们仅仅为预测值, 因此有不确定性在里面。这些指数的置信区间可以反映这种不确定性^[1]。如: 对于工序能力指数 \hat{C}_P , 预测值的 100(1- α)% 的双侧置信区间即为

$$\hat{C}_P \sqrt{\frac{\chi_{1-\alpha/2, n-1}^2}{n-1}} \leq C_P \leq \hat{C}_P \sqrt{\frac{\chi_{\alpha/2, n-1}^2}{n-1}}$$

式中 $\chi_{1-\alpha/2, n-1}^2$ 和 $\chi_{\alpha/2, n-1}^2$ 为自由度为 $n-1$ 的卡方分布的上下两个 $\alpha/2$ 百分点。

指数实际值落于该区间的可信度为 100(1- α)%。表 7 是两个不同 \hat{C}_P 在不同样本量情况下的 95% 的双侧置信区间范围。

表 7 两个不同 \hat{C}_P 不同样本量的 95% 的双侧置信区间范围

n	$\hat{C}_P = 1.00$		$\hat{C}_P = 1.33$	
	低限	高限	低限	高限
10	0.55	1.45	0.73	1.93
30	0.74	1.26	0.99	1.67
100	0.86	1.14	1.14	1.51
200	0.90	1.10	1.20	1.46

从表中可看出, 在样本量为 30, 置信度为 95% 时, $\hat{C}_P = 1.00$ 就表明是实际的工序能力 C_P 位于 0.74~1.26。如果注重单侧的话, 就只需算出单侧置信区间。

另一方面, 如果想知道在一定的置信度 100(1- α)% 下, 真实的 C_P 是上面某个值 (如 $C_P = 1.0$ 时) 可接受的最小工序能力指数 \hat{C}_P , 最小 \hat{C}_P 就可用下面的公式计算: 最小 $\hat{C}_P = \hat{C}_P / \sqrt{\chi_{1-\alpha, n-1}^2 / (n-1)}$ 。式中 n 为样本数; α 为风险水平。该式有助于在方案制定时, 为确保一定的 C_P 而首先确定样本量。表 8 中显示的是不同样本量情况下, 在置信度至少为 95%, 实际能力指数为 1.00 或 1.33 时所需的样本能力指数。

表 8 实际能力指数为 1.00 或 1.33 时所需的样本
能力指数 (95%置信度)

n	$C_P=1.00$	$C_P=1.33$
10	1.65	2.19
30	1.28	1.70
100	1.13	1.51
200	1.09	1.45

在有些情况下,其他指数 (P_P , C_{PK} 或 P_{PK}) 的置信区间也可通过上述公式进行推导。但这些区间也只能当作是近似的。文献[13, 14]中提供了这些置信区间的统计近似值。对于 C_{PK} ,人们通常应用近似的置信区间。假定 \hat{C}_{PK} 的分布是正态的, Taylor 序列运用如下公式设定 C_{PK} 的 $100(1-\alpha)\%$ 的置信区间:

$$\hat{C}_{PK} \pm Z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{1}{9n} + \frac{\hat{C}_{PK}^2}{2n-2}}$$

$Z_{\alpha/2}$ 指标准正态分布的上 $\alpha/2$ 分位数,如 $Z_{\alpha/2}=1.96$ 用于产生 95% 的双侧置信区间。

从上面的例子可以看出,从小样本量数据得出的能力指数或性能指数可能产生误导。除非有大的样本量或这些预测值给出了一定的置信区间,否则这些预测值是不可用的。

6. 非正态分布

只有在得到的数据处于正态分布的前提下, 6σ 才被用于确定工序能力指数。当数据非正态分布时,较大的工序

能力指数(这暗示有工序能力)可能源于无能力的工序。同样,由于数据的非正态分布,有能力的工序也可能给出较低的工序能力指数。有很多方法可检测数据是否为正态分布。常规的直方图就可很好评判数据是否处于正态分布。概率图、卡方拟和检验及 Anderson-Darling 统计等统计方法均可用于判断数据是否为正态分布^[15]。如果判断结果表明数据处于非正态分布,将有 4 种选择可供提供^[16]:

- 通过数据转换,是转换后的数据处于正态分布。如果数据右倾,可以试用对数、倒数、平方根或立方根等方式转换数据,实现数据正态分布。如果数据左倾,可以试用指数、平方或立方等方式转换数据。在转换前后可应用直方图评定通过转换数据是否实现正态分布。在计算相关指数前,USL 和 LSL 同样需用转化数据。

- 采用一个已知的分布,用与已知非正态分布相一致的 2.5% 和 97.5% 点相乘(目的是达到 95% 的置信度)。 γ 分布是一个常用的且可拟和多数分布的非正态分布。

- 把指数作为一个相对的测量并在报告中标出。即使数据分布是非正态且不对称的,这个指数还是有一定意义的。但是分布偏态很严重时,就应考虑这样做是否合适了。

- 所获得结果可能误导大家,因此放弃计算能力指数和性能指数。

7. 工序能力的实例

此案例研究的是一个假定处方药的胶囊质量。胶囊的质量规格是 290~350mg,每 20min 抽样 4 次,称量。得到 100 个数据,分为 25 个亚组,每组 4 个。图 6 为结果概括。

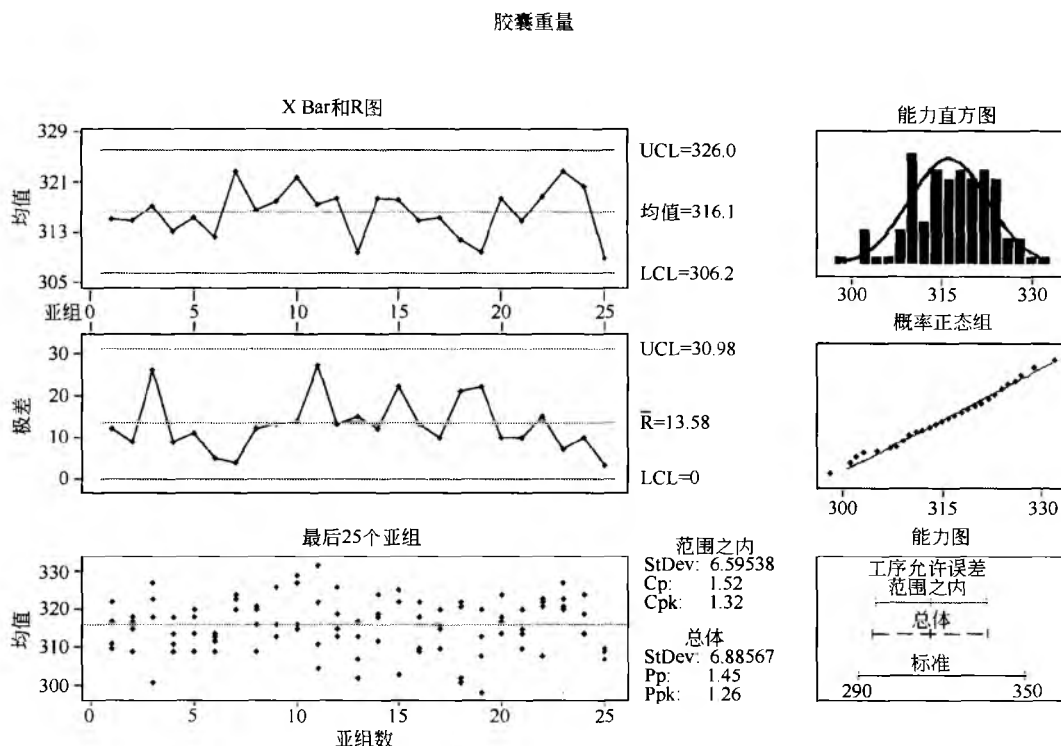


图 6 应用 Minitab 软件得出的胶囊质量的统计学描述



控制图分析表明,所有均值和极差都落在相应的控制线内,说明工序处于统计控制状态。数据分布的直方图中,数据分布也和正态分布概率点相近,表明数据近似正态分布。

算出的 $\hat{\sigma}_P$ 和 $\hat{\sigma}_C$ 分别为6.89和6.60mg,因为工序处于统计控制,所以这两个值相近。由于工序并非严格无偏,所以 \hat{C}_{PK} 要比 \hat{C}_P 小,两值分别为1.32和1.52。因为工序处于统计控制,所以工序实现指数的预测就无太大必要,计算结果也表明预测值和工序能力指数预测值接近(注:在Minitab软件中,预测值均未标出,但实为预测值)。

如果一个工序不在统计控制状态,那么 \hat{P}_P 和 \hat{P}_{PK} 可用于判断数据收集时间的工序执行状态。在工序被带入统计控制状态后, \hat{C}_P 和 \hat{C}_{PK} 指数就可用于评定工序能力。

8. 统计控制和工序能力间的关系

总之,即便处于统计状态的工序,也有可能是无能力的,认识到这一点极为重要。严格来讲,对于并不在严格统计控制状态下的工序,讨论其工序能力是毫无意义的(因为这样的工序是不稳定的且不可预知的)。在实际操作中,只有当前存在这些指数时,才提供工序指数来评估工序。当评判一个非统计控制工序时,必须获取足够多的可涉及所有工序变异的数据。当获取了大量的这些数据后,可以判断一个非统计控制工序处于规格限内的能力。然而,即便工序是有能力的,这些数据对消除所有引起特殊原因变异的工作仍有用。

在制药行业中的应用

1. 典型的应用

本章讨论的概念可应用于制药行业的很多方面,包括如下:

- 药效;
- 生产出的药品性质(如均一度和分散度);
- 一批药片/胶囊的特性(质量、厚度、硬度和崩解时限等等);
- 颗粒剂特性(平均粒径、密度等);
- 菌落数;
- 药物剂量控制(鼻腔喷雾等);
- 填充质量和填充体积;
- 空气/氧气净化系统;
- 残渣;
- 液体制剂特点(黏度和折光度等);
- 消费者投诉和生产安全措施等。

使工序处于或接近统计控制状态可以减少可变因素、改善工序,从而使产品符合质量规范。这对于生产者和消费者都有好处。应用SPC评估、改善工序的方法不仅可用在诸如片重、片的硬度等产品的特性方面,而且可应用于像消费者投诉、排队时间和生产安全措施等产品实现环节。

通过SPC改善工序,也可以达到减少生产过剩、减少生产浪费和降低次品率的目的。在消除干扰因素后,就可以轻松地监控整个工序而且避免新干扰因素的出现。

如前所述,作为工序能力考察的一部分,工序的变异性也包括其中。这里的变异包括工序和检测方法两方面。在测定一些产品特性(如:力度、装量均一性和分散度)时,变异就尤显重要了。在所有关于如何改善工序的研究中,很重要的一点是把工序变异和检测方法变异区分开来。样本只有按预先设计的方式检测,方可有效区分两种不同来源的变异。通过重复检测考察,方法变异可以被单独指明。

2. 工序中的数据析

在工序的确立和后来的生产过程中,对于监控和改善工序,控制图一直是一个有效的分析工具。在生产工程中,控制图主要用来使不同批次的产品保持一致规格。在片剂工序中,最常见的就是在工序中检测药片的质量、厚度和硬度。相关参数必须是可控制的,这样才可作相应的调整。在生产进行的最初阶段,对工序应尽可能地少作调整,以了解工序的原始状态。所作的任何调整需记录在案并作相应解释。在进行工序能力分析前,任何超过控制限的数据都不应舍去。如果发现干扰因素,那就应改善工序以消除这些干扰因素。

对于任何新产品,在工序被确定之前(工序研究和中试时),应当进行工序评估和工序改进活动。对于生产工序中所有的设备都须把关。我们的经验表明,在生产中评估片剂和胶囊的相关质量参数时,一个好的设置对于确保工序按预设开始是极为重要的。另外,如为了休息或吃饭而暂停生产流水线,漏掉次品的行为都会因前后颗粒不均匀而增加干扰因素。

像片剂的片重、厚度和硬度等特性,由于产品特性相互关联,所以就不能把一个特性完全分开而使其处于严格的统计控制状态。对于同一药片的片重、厚度和硬度的考察,将有助于使人们更好地理解这些药片特性之间相互关联的特性。对于这些特性,产品的规格就需在个值或均值方面做出规定。如果考察均值,那么工序能力指数就不适宜用于评估单个产品是否符合规范了。

例如:有些工序检测图用10片药片的平均质量考察片重。这样每个取样点就抽取10片药片并逐个称量,最后求出平均片重并绘图。这种情况下,个体动态极差图就可用于评估片重的统计控制状态。但是当这些规格源于个体时,这些数据就不适合用于工序能力研究。

记住工序可能处于统计控制状态中但还是不具有工序能力这一点很重要。对于临界参数的极差研究可以有助于让人们了解规格限是否订得偏高,在无规格限的情况下,临界参数的极差分析将有助于制定规格限。极差研究将有助于确定上下极值,而这些参数可以用于考察该产品是否符合质量标准要求。例如,符合崩解时限和外观要求的片剂硬度的上下极值将有助于确定工序中的产品质量规范。

T

如果工序是无能力的,可能是由于最初规格被设定在 $\pm 3\sigma$ 限,却没确定什么是合格品,这也正是极差研究的目的所在。如果做了这些工作,那么能力指数应可达到 1.0 左右。

3. 产品分析(如认证、年度产品回顾等)

能力指数和性能指数是很引人注目的工序评估工具。因为他们把工序实现和产品质量标准通过一个检测联系起来。有时在认证报告或年度产品评论中,工序性能指数作为可被接受的标准使用,但使用时要特别小心。样本量太小的话就不可能给出可信的预测值,特别是在决定认证或年度产品评论通过与否时。如果事先并没有努力使工序处于统计控制状态,但却一味强调应用能力指数,其实是毫无意义。虽然笔者并不推荐用能力指数作为认证和年度产品评论的接收标准,但是如果运用适当的话,能力指数是度量不同阶段工序实现情况的有效标尺,能力指数也可度量不同批次产品以便确定工序中需要优先改善的地方。这些指数也提供了衡量改进效果的指标,使这种改进效果易于理解的语言表达出来。同样这些指数有时也是限的,当工序能力和成品的测试要求联系起来(例如能满足 MSP 对含量均匀度、溶出度的多阶段测试),能够更好地证明固体制剂工序能力时,这些指数就没用了。

如果企图在实验室里对产品进行过多的检测,就会因为检测花费太多的时间而阻止大量的终产品处于严格的统计控制。因此并不推荐认证研究或年度产品回顾需要工序处于统计控制状态才被接受,甚至对于包括如片重、厚度及硬度等的产品质量特性也不推荐非要处于统计控制。不处于严格统计控制的工序同样能够符合相关规范并通过认证。然而,如果工序不处于统计控制,那么就on应该努力消除工序干扰因素而使工序处于近统计控制状态。认证报告或年度产品评论的数据有助于决定怎样改进工序。

虽然这些理论主要是针对终产品数据的,但大多数同样适用于生产过程中产品的数据。

4. 制药行业中的限制

正如前面所说的,要使药厂的工序处于统计控制状态通常是比较困难的。由于流程的特性,导致药品的特性如片重、厚度与硬度等总是相关的。由于应用同样的原材料或在同一天检测,从连续几批产品得出的数据是相关的。如果应用前面所讨论的可改善工序和维持工序处于控制状态的技术可获益颇多,因此这样的工作即便辛苦也值得去做。

Nash^[17]指出在其他行业可能实现的一些指标并不一定能在制药行业实现,如 C_{PK} 并不能总是达到 1.33。药品的规范应以消费者为导向,确保安全和有效而不应着眼于工序的连贯性。相关的内在控制限应服务于此目的。我们的许多规范不是源于《美国药典》就是受美国药品食品管理局影响,而这两方面均鼓励制药公司设定和工序紧密配合的标准。在还没得全部经验之前,有时公司被要求以他们看到的规范作为自己的严格规范。总之,一旦遇到状态不

稳、不同批次生产工序不同、分析方法的微小偏差等引起检测和工序变化,次品率不可能总是控制在 $C_{PK} = 1.33$ 时要求的百万分之几的水平。如果检测方法误差太大的话,武断预设的 C_{PK} 在实际操作中是很难实现的,即便对工序进行了很大程度的改善^[11]。

对于制药行业而言,第一个将某种新药推向市场是极度重要的。花费时间使工序处于统治控制状态通常被公司认为是减慢了新药导入市场的速度而不能带来价值。这种态度应该有所改变了。另外,制药公司注意到因改善工序和减少可变因素带来的结果是 FDA 将进一步加强规范要求,因而有使产品不符合质量要求的风险。无论什么时候,对已在 FDA 备案的项目进行明显改动,就需 FDA 再认证或重新备案。这种要求降低了制药公司对工序进行改善的兴趣。笔者认为制药公司和 FDA 有必要对这些规定进行讨论,以确保公司对于工序的改进是有回报的,最终实现多赢(特别是消费者)的局面。FDA 的 Woodcock 已呼吁 FDA 和制药厂家共同努力推进制药厂的改进^[18]。

结论

本章详细介绍了应用 SPC 来改善工序和应用工序能力来评估工序是否符合相关的规范。详细描述这些工具是为了确保制药公司在生产线上可以正确地对其加以应用。为了加强认识,本章提供了一些假设应用这些工具的范例,同时还讨论了这些工具在应用中特别是在制药厂应用的一些注意事项。

本章的目的就是希望可以鼓励制药厂家正确合理地应用这些重要的工序改进和工序评估工具。文中提到了在制药行业应用这些工具的障碍,我们也希望通过制药厂和 FDA 的共同努力来解决这些问题。

参考文献

1. Montgomery, D. C. Introduction to Statistical Quality Control, 4th Ed.; Wiley, 2001.
2. Ryan, T. P. Statistical Methods for Quality Improvement, 2th Ed.; Wiley, 2000.
3. Manual on Presentation of Data and Control Chart Analysis, 7th Ed.; ASTM International, 2002.
4. Box, G. E. P.; Luceño, A. Statistical Control in Monitoring and Feedback Adjustment; Wiley, 1997.
5. Statistical Quality Control Handbook; Western Electric Company, 1956.
6. Champ, C. W.; Woodall, W. H. Exact results for Shewhart control charts with supplementary runs rules. *Technometrics* 1987, 29 (4), 393—399.
7. Nelson, L. S. Control chart for multiple stream processes. *J. Qual. Technol.* 1986, 18 (4), 255—256.
8. Box, G. E. George's column. *Qual. Eng.* 1991—1992, 4 (1), 143—151.

9. Box, G. E. George's column. *Qual. Eng.* 1991—1992, 4 (2), 331—338.
10. Kane, K. Process capability indices. *J. Qual. Technol.* 1986, 18 (1), 41—52.
11. Gunter, B. The use and abuse of C_{PK} , Part 4. *Qual. Prog.* 1989, 22 (7), 86—87.
12. Pruett, J. M.; Schneider, H. *Essentials of SPC in the Process Industries*, 2nd Ed.; Instrument Society of America, 1996.
13. Rodriguez, R. Recent developments in process capability analysis. *J. Qual. Technol.* 1992, 24 (4), 176—187.
14. Kushler, R. H.; Hurley, P. Confidence bounds for capability indices. *J. Qual. Technol.* 1992, 24 (4), 188—195.
15. Shapiro, S. *How to Test Normality and Other Distributional Assumptions*; How To Series, ASQ 1990; Vol. 3.
16. *Quality Assurance for the Chemical and Process Industries, a Manual of Good Practices*, 2nd Ed.; ASQ Quality Press, 1999; 42.
17. Nash, R. A. Understanding the process capability index concept. *J. Valid. Technol.* 1998, 4 (3), 202—204.
18. Regulatory Leeway sought for process analytical technology. *Gold Sheet* February 2002, 36 (2), 1—19.

(黄卓译)

T

T

统计学方法

Charles Bon

AAI International, Wilmington, North Carolina, U. S. A.

引言

正如一句古老的谚语所说, 人一生中可以肯定会发生的事只有两件: 死亡和纳税。尽管这是种夸张的说法, 但它强调了我们制药学家所生活和工作的这个世界是不确定的。对于产品性质的“估计”, 如效力、含量均匀度、杂质水平和溶出表现, 科学家必须做出合格或不合格这样重要的决定。与大多数测量数据一样, 这些估计值必然同作为正确判断依据的真实值之间存在差异。统计学方法为制药学家提供工具, 使他们能够在不确定中做出决断。理解基本统计学方法对于所有从事制药行业的人来说是非常重要的。

一些基本概念

在很多药物的研发过程中, 正常人或者患者在受控情况下用药, 这是为了研究产品中活性成分的吸收速率和分布, 即生物利用度。通过给药后一段时间内连续收集的血液中药物浓度的测定, 可估计生物利用度。在基本统计学原理的指导下, 可用经典的生物检测步骤来测定收集的血液中的药物浓度。

经典检测方法的第一步或许是用一次性的血清吸头吸 0.5mL 样品到一个螺口培养管, 然后加入 100 μ L 与目标药物结构相似的内标。再加入少量合适的 pH 缓冲液, 如 1.0mL, 以降低药物和内标的水溶性。充分混匀后, 在管中加入 7mL 乙醚, 盖上盖子后振摇, 将药物和内标萃取到有机醚相中。将培养管离心使水相和有机相完全分开。取 5mL 有机相溶液至一干净的培养管中, 用氮气吹干。将残留物溶于 100 μ L 由乙腈、甲醇及缓冲液组成的流动相中, 取 10 μ L 注入装有 3 μ m、C8 色谱柱的高压液相色谱 (HPLC) 中进行分析。柱流出液在 280nm 下进行紫外检测, 可以检测到药物和内标的响应: 峰面积或者峰高。通过计算药物峰与内标峰的响应比, 就能从校准曲线上内插得到每个样品中药物浓度的估计值。校准曲线由萃取校准样品的峰响应比得到, 校准样品由已知量的药物和对样品无干扰的血液组成。

在浓度估计中存在着几个明显的误差来源以致其不确定性。例如, 如果错加了 1.0mL 的样品而不是 0.5mL, 而制备校准样品时采用的是正确的体积, 就会产生系统误差。系统误差在估计中会导致一个恒定的、可预测的误差。要处理系统误差, 我们必须承认其发生并纠正导致其发生的错误。统计学方法并不针对系统误差。然而, 如果正确

加入 0.5mL 样品和 100 μ L 内标, 对浓度的估计仍然会存在误差, 这些误差是随机误差。随机误差是在任何试图精确测量时, 必然发生的正偏离和负偏离, 如以上情况下对样品和内标体积的测量。我们或许会因为移液时的一个未被察觉的气泡而转移了 0.498mL 样品, 或者因为一些样品沾在吸头外侧而转移了 0.502mL。统计学方法成了我们处理随机误差 (机会) 导致的不确定性的工具。

在样品转移和内标加入后, 药物内标比就是一个定值, 任何额外的随机或系统误差都不会影响浓度估计。不过, 在复溶样品 HPLC 进样时, 又会产生随机误差从而影响估计值。这是药物和内标在流动相和柱之间分配时机会偏差的结果。紫外检测系统的随机波动同样会影响浓度估计值。随机误差的影响是统计学加成的。在我们所举的例子中, 随机误差是相互独立的, 也就是说, 每个随机误差的发生、符号 (正或负) 和放大都与其他随机误差的发生、符号和放大无关。这同关联误差相反, 关联误差间通过一些可预测的方式发生联系。

任何分析方法都有两个重要的特性: 精确性和重现性。精确性是指样本估计值同真实值之间的接近程度, 重现性是同一样本的多次估计值同它们的平均值之间的背离程度。精确性和重现性通常都在一个特定的浓度下定义, 它们会随着样本浓度高低而改变。对于一个好的分析方法, 这一改变在工作范围内小到可以忽略不计。

一个估计的期望值是无限次测定估计的平均值。这些无限次的测定作为一个集合, 构成了估计的总体。一个总体在数量上并不要求是无限的。有限总体有如已知数量的大量药片的效力或是所有经过某种降压治疗的患者来年的血压值。总体均值 (μ) 是总体的一个参数。从单一样本浓度估计得到的 μ 值会随每次测量而变化, 在一定程度上被看作是变量。如果一个变量用于描述连续值, 如我们举例中的浓度估计, 这个变量就被称为连续变量。用于描述特定的单个离散值的变量, 如 50kg 原料药制成的药片数量, 被称为离散变量。

我们无法通过对一个样本进行无限次的抽样来确定一个方法的精确性, 因此得通过有限次 (n) 的抽样来对此进行估计。我们通过多次测量的平均值 ($\bar{x} = \sum x_i / n, i = 1, 2, \dots, n$) 来反映精确性, 用一个已知浓度的百分数来表示。有限次的测量值是总体的一个样本, 其平均值被称为样本均值。样本均值是一个对总体参数 μ 进行估计的统计量。如果我们能从无限个相同容量的样本中得到各自的平均值, 那么无论容量大小, 这些均值的平均值就等于 μ 。统计术语中, 我们称样本均值是总体均值的无偏估计。无偏是任何统计量的理想属性。有些统计量仅当样本容量很大时才是无偏

的, 这些统计量被称为是渐近无偏的。要充分利用这些统计量就得处理大样本, 如由 20~30 次测量所得到的样本, 而不是 2~10 次测量所得到的的小样本。

测量方法的重现性或精密度, 表示个别估计值围绕平均值波动的程度。总体中对波动的衡量用方差 (σ^2) 这一参数表示。方差是总体中所有 x_i 值同 μ 偏差的平方的平均值: $\Sigma(x_i - \mu)^2 / N$ 。对于从总体中取得的样本, σ^2 的一个无偏估计是从每个围绕均值 (\bar{x}) 的绝对偏差中得到的: $s^2 = \Sigma(x_i - \bar{x})^2 / (n-1) = [\Sigma x_i^2 - (\Sigma x_i)^2 / n] / (n-1)$ 。

等式中不含 \bar{x} 的形式是一个方便计算的公式, 避免了当个体值非常接近均值时产生的舍入问题。我们普遍采用样本方差的平方根: 标准差 s 。标准差常被标准化为偏差的百分系数 CV%, 方法是除以样本均值并用百分数表示。在药物剂量单位分析和 FDA 相关规定中, 这一算法用相对标准背离 (RSD) 而不是 CV% 表示。

假设对一个统计量有两个估计: 一个来自于容量为 n 的样本, 另一个来自于容量为 $2n$ 的样本, 人们或许会认为来自大样本的估计会比来自小样本的更可靠。事实上这是有统计学理论依据的。如果总体的方差是 σ^2 , 那么容量为 n 的样本均值的方差就是 σ^2 / n , 其平方根就是均值的标准误差。与样本均值的方差是单一测量的方差 (σ^2) 的 $1/n$ 相一致, 样本均值的标准差和 CV% 得除以 n 的平方根。作为一个直接的推论, 同一个分析方法, 依赖于两个独立浓度检测均值的相对于一个浓度检测的, CV% 值是后者的 $1/\sqrt{2}$ 。这就提供了一个提高精密度的简单方法。放射免疫分析中就有这样的例子, 通常一个浓度估计值由一个样本的两个观察值的均值计算得到。

正如前面所提到的, 浓度估计值在真实值周围的波动来源于多次、独立的随机误差。每个随机误差 (σ_i^2) 都是统计学加成的, 即整个分析误差: $\sigma^2 = \Sigma \sigma_i^2$ 。同样, 分析方法的 CV% 也就成为分析方法中所有独立的误差来源的 CV% 值平方和的平方根。检验其对于给药后的最大药物浓度 C_{\max} 这一重要药代参数的影响时会得到很有意思的结论。对很多药物来说, 生物学差异, 以及对同一个体重重复给药时 C_{\max} 真实值的变化程度, 其 CV 值会达到 25% 或以上。如果一个 CV 为 10% 的分析方法, 其生物学差异的 CV 达到 25%, 那么 C_{\max} 估计值的 CV 是 26.9%。这是通过两者独立误差 CV 的平方和 $25^2 + 10^2$ 的平方根得到的。如果分析方法的精密度提高为 5% CV, C_{\max} CV 估计为 25.5%。也就是说, 将 10% CV 降为一半所付出的努力, 换来的只是整个精密度 1.4% 的提高, 这样做几乎是不值得的。

一个有用的统计分布

正态分布在科学界和自然界中广泛存在。应用正态分布理论的制药学文献也有很多。正态分布是最早提出的分布之一, 早在 1733 年就由 De Moivre 发表。大多数科学家都基本熟悉正态分布及其典型的钟形曲线 (图 1)。柱层析领域的科学家或许会把这个形状当作是完美的层析峰。事

实上, 层析峰的对称性以及峰与峰之间的分辨率都可以用正态分布理论解释。正态分布用两个参数来定义: 一个是 μ , 定义为分布的中心位置; 另一位数是 σ , 定义为分布相对于中心位置的延伸。正态分布有一些独特的属性: 其平均值与其中位数一样, 总体的 50% 低于这个值, 剩下的 50% 则高于这个值; 正态分布是对称的, 中位数以下的部分是中位数以上部分的镜像; 其众数, 也就是出现频率最高的值, 同样与其均值和中位数相一致, 与均值的偏差在 σ 以内的占分布的 68% 左右; 在 2σ 以内的占 95%; 在 3σ 以内的占 99.8%。自然界中许多观察到的行为, 以及科学界中许多测量方法都能用正态分布来近似。正态分布很早就被普遍应用的一个重要的属性反映在中心极限定理中。该定理是这样陈述的: 无论一个总体是否符合正态分布, 其随机样本均值的分布总是趋于正态分布, 这一趋势随样本容量的增加而增加。如果总体正好是正态分布的, 那么样本容量为 1 就足够了。总体分布越是远离正态分布, 要使均值服从正态分布, 需要的样本容量就越大。

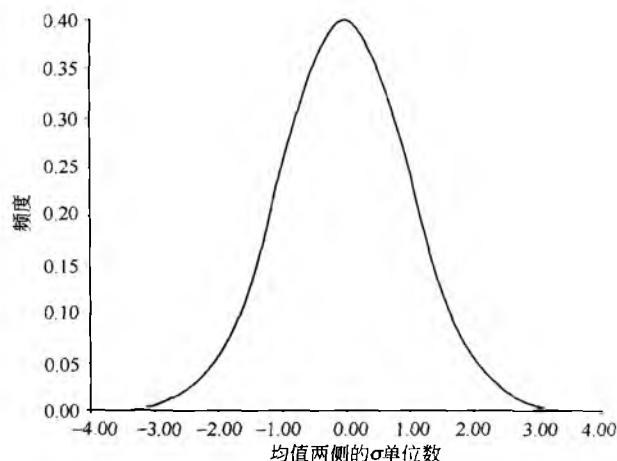


图 1 正态分布

质疑血样中药物浓度的估计值是否能被近似看作正态分布是合理的。表 1 描述了对一个含有已知量药物的无干扰血浆样品的重复分析, 这些数据来自于比较生物利用度研究, 就是将单一剂量的某种未上市的药物和一种上市的药物分别给予健康雄性动物。给出的这些数值是每批受试者样品中的质控 (QC) 样品的两次测定中的第一个。这样做是为了证实该分析方法过程精确性和精密度同方法验证过程中得到的观察值相一致。

表 1 质控样品分析结果

批次	浓度/ (ng/mL)	批次	浓度/ (ng/mL)
1	188	5	214
2	216	6	209
3	201	7	226
4	166	8	183

续表

批次	浓度/ (ng/mL)	批次	浓度/ (ng/mL)
9	210	28	237
10	213	29	212
11	209	30	239
12	222	31	207
13	214	32	216
14	213	33	213
15	205	34	226
16	226	35	213
17	203	36	204
18	188	37	194
19	215	38	218
20	211	39	207
21	201	40	196
22	205	41	208
23	206	42	210
24	201	平均	207.6
25	197	中位数	209
26	199	众数	213
27	180	标准偏差	14.1

图2左部显示了这一结果的频率柱状图，右部是均值为207.6ng/mL， σ 为14.1ng/mL的正态分布。这一频率柱状图的形态和正态分布非常相似。两者最大的偏差出现在柱状图的中心区域。样本在柱状图中心的分布较为集中，为42%，而在正态分布中为38%。如果两者的均值、中位数以及QC值众数服从正态分布，则这些值应基本相同，这也是我们所希望的。

把每个 x_i 值转化为标准正态值是正态分布一个用途特别广泛的形式。这一转化使得分布独立于 μ 和 σ 。转化公式为： $Z_i = (x_i - \mu) / \sigma$ ，其中 Z_i 是服从 $\mu=0$ 、 $\sigma=1$ 正态分布的标准正态偏差。在所有基础统计学教科书中都能找到如表2那样的Z值表。标准正态分布偏差表特地提供了分布的曲线下面积，其位于 $-\infty$ 到不同Z值（下部）之间或不同Z值到 $+\infty$ （上部）之间。围绕 μ 值在给定Z值范围之间的分布比例可以通过计算表中 $+Z$ 和 $-Z$ 两部分面积之差值得到。

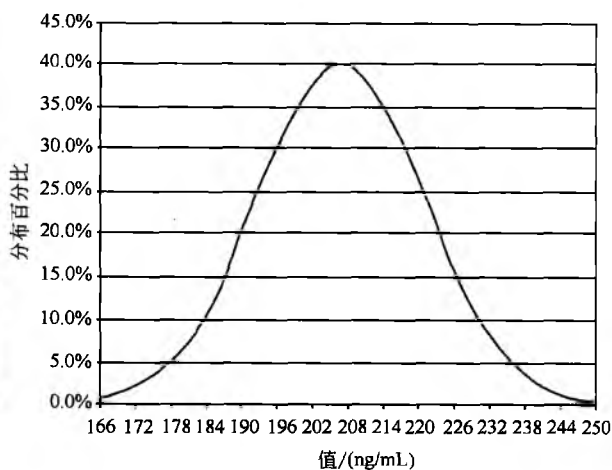
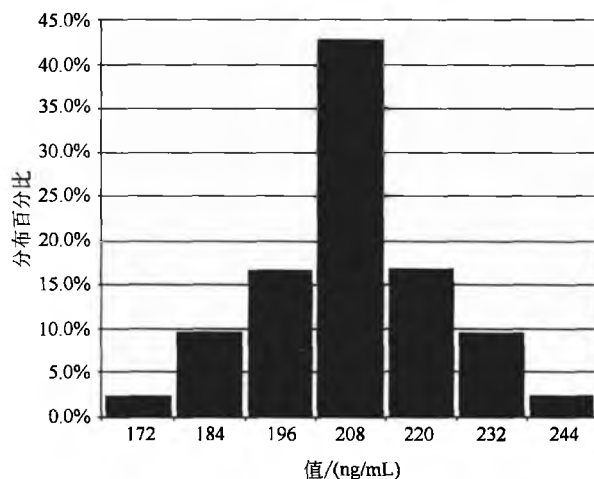


图2 QC频率柱状图及其对应的正态分布

表2 标准正态曲线下的面积（从 $-\infty$ 到Z）^{1), 2)}

Z	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
0.0	0.5000	0.5040	0.5080	0.5120	0.5160	0.5199	0.5239	0.5279	0.5319	0.5359
0.1	0.5398	0.5438	0.5478	0.5517	0.5557	0.5596	0.5636	0.5675	0.5714	0.5753
0.2	0.5793	0.5832	0.5871	0.5910	0.5948	0.5987	0.6026	0.6064	0.6103	0.6141
0.3	0.6179	0.6217	0.6255	0.6293	0.6331	0.6368	0.6406	0.6443	0.6480	0.6517
0.4	0.6554	0.6591	0.6628	0.6664	0.6700	0.6736	0.6772	0.6808	0.6844	0.6879
0.5	0.6915	0.6950	0.6985	0.7019	0.7054	0.7088	0.7123	0.7157	0.7190	0.7224
0.6	0.7257	0.7291	0.7324	0.7357	0.7389	0.7422	0.7454	0.7486	0.7517	0.7549
0.7	0.7580	0.7611	0.7642	0.7673	0.7704	0.7734	0.7764	0.7794	0.7823	0.7852

续表

Z	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
0.8	0.7881	0.7910	0.7939	0.7967	0.7995	0.8023	0.8051	0.8078	0.8106	0.8133
0.9	0.8159	0.8186	0.8212	0.8238	0.8264	0.8289	0.8315	0.8340	0.8365	0.8389
1.0	0.8413	0.8438	0.8461	0.8485	0.8508	0.8531	0.8554	0.8577	0.8599	0.8621
1.1	0.8643	0.8665	0.8686	0.8708	0.8729	0.8749	0.8770	0.8790	0.8810	0.8830
1.2	0.8849	0.8869	0.8888	0.8907	0.8925	0.8944	0.8962	0.8980	0.8997	0.9015
1.3	0.9032	0.9049	0.9066	0.9082	0.9099	0.9115	0.9131	0.9147	0.9162	0.9177
1.4	0.9192	0.9207	0.9222	0.9236	0.9251	0.9265	0.9279	0.9292	0.9306	0.9319
1.5	0.9332	0.9345	0.9357	0.9370	0.9382	0.9394	0.9406	0.9418	0.9429	0.9441
1.6	0.9452	0.9463	0.9474	0.9484	0.9495	0.9505	0.9515	0.9525	0.9535	0.9545
1.7	0.9554	0.9564	0.9573	0.9582	0.9591	0.9599	0.9608	0.9616	0.9625	0.9633
1.8	0.9641	0.9649	0.9656	0.9664	0.9671	0.9678	0.9686	0.9693	0.9699	0.9706
1.9	0.9713	0.9719	0.9726	0.9732	0.9738	0.9744	0.9750	0.9756	0.9761	0.9767
2.0	0.9772	0.9778	0.9783	0.9788	0.9793	0.9798	0.9803	0.9808	0.9812	0.9817
2.1	0.9821	0.9826	0.9830	0.9834	0.9838	0.9842	0.9846	0.9850	0.9854	0.9857
2.2	0.9861	0.9864	0.9868	0.9871	0.9875	0.9878	0.9881	0.9884	0.9887	0.9890
2.3	0.9893	0.9896	0.9898	0.9901	0.9904	0.9906	0.9909	0.9911	0.9913	0.9916
2.4	0.9918	0.9920	0.9922	0.9925	0.9927	0.9929	0.9931	0.9932	0.9934	0.9936
2.5	0.9938	0.9940	0.9941	0.9943	0.9945	0.9946	0.9948	0.9949	0.9951	0.9952
2.6	0.9953	0.9955	0.9956	0.9957	0.9959	0.9960	0.9961	0.9962	0.9963	0.9964
2.7	0.9965	0.9966	0.9967	0.9968	0.9969	0.9970	0.9971	0.9972	0.9973	0.9974
2.8	0.9974	0.9975	0.9976	0.9977	0.9977	0.9978	0.9979	0.9979	0.9980	0.9981
2.9	0.9981	0.9982	0.9982	0.9983	0.9984	0.9984	0.9985	0.9985	0.9986	0.9986
3.0	0.9987	0.9987	0.9987	0.9988	0.9988	0.9989	0.9989	0.9989	0.9990	0.9990
3.1	0.9990	0.9991	0.9991	0.9991	0.9992	0.9992	0.9992	0.9992	0.9993	0.9993
3.2	0.9993	0.9993	0.9994	0.9994	0.9994	0.9994	0.9994	0.9995	0.9995	0.9995
3.3	0.9995	0.9995	0.9995	0.9996	0.9996	0.9996	0.9996	0.9996	0.9996	0.9997
3.4	0.9997	0.9997	0.9997	0.9997	0.9997	0.9997	0.9997	0.9997	0.9997	0.9998

1) 通过Z值得到面积。例如, $Z=1.96$ (查找行1.9, 列0.06) 的面积是0.9750, 表示97.5%的标准正态分布低于该Z值, 另外的2.5%高于该Z值。负Z值的面积由1减去相应的正Z值面积得到。如 $Z=-1.96$ 的面积是 $1-0.9750=0.0250$ 。

2) 表中数值由SAS系统生成。

表3显示了 μ 周围一些给定的Z值范围中标准正态分布的期望百分比, 并且与在这些范围内QC样本分布的比例进行了比较。样本分布比例由各范围中QC值的数量除以样本中QC值的总数42, 并用百分数表示得到。因为 μ 和 σ 是未知的, 计算中用样本均值和标准差代替。每个范围的下限和上限的值(单位为ng/mL), 通过 $[\bar{x}-Z \cdot s]$ 和 $[\bar{x}+Z \cdot s]$ 计算得出。

表3 质控样品分析结果的分布

平均值的 $\pm Z$ 单位	期望百分数/%	观测百分数/%
3.0	99.7	100
2.5	99	98
2.0	95	93
1.5	87	88
1.0	68	74
0.7	52	64
0.5	38	55
0.2	18	24
0.1	8	12

频率柱状图中, 在均值附近, $Z=-1$ 到 $Z=1$ 间的QC值的分布, 要比正态分布理论值来得高。不过, 这一范围之外的分布则接近于正态分布变量。确定一个变量是否服从一定的统计分布的适合度检验可通过卡方统计量进行(表4)。将样本值的范围分成多个区间, 计算落在每个区间中的数值个数的期望值(E)。区间应该足够大, 使得其中至少包含五个观察值, 这点非常重要。这样就能算出落在每个区间中的样本观察值的个数(O)。该检验的卡方统计量为: $\chi^2 = \sum[(O-E)^2/E]$ 。如果计算得到的统计量超过了临界上限, 即 $\alpha=0.05$ (测量水平 $p=0.05$) 时的卡方值, 我们就拒绝样本分布同假定分布相一致的假设。如果计算值小于临界上限, 我们就接受假设。

卡方表(表5)根据所计算的统计量的显著性水平(如 $p=0.05$) 以及自由度(df) 绘制。适合度检验的自由度是区间总数减去1。在我们所举的例子中, 如果假设统计分布的总体参数是未知的, 而且必须从样本中估计得到, 那么自由度就会随着需要估计的参数的增多而进一步减小。在这个例子中, 我们分了8个区间, 并估计样本正态分布的均值和方差, 自由度为 $8-1-2=5$, 得到 $\alpha=0.05$, $df=5$ 。

表4 卡方适合度检验

Z_{low}	Z_{high}	理论面积	$\bar{x} - Z_{\text{low}} * s$	$\bar{x} + Z_{\text{high}} * s$	期望 (E)	观察 (O)	$(O-E)^2/E$
24.00	21.18	0.1190	151.2	191.0	5	5	0.000
21.18	20.72	0.1168	191.0	197.5	5	3	0.800
20.72	20.37	0.1199	197.5	202.4	5	4	0.200
20.37	0.00	0.1443	202.4	207.6	6	7	0.167
0.00	0.37	0.1443	207.6	212.9	6	7	0.167
0.37	0.72	0.1199	212.9	217.8	5	9	3.200
0.72	1.18	0.1168	217.8	224.3	5	2	1.800
1.18	4.00	0.1190	224.3	264.1	5	5	0.000

注: Sum=6.33; 临界 $\chi^2=9.25$ 。

的临界卡方值是 9.24。根据表 4, 我们的计算值 6.33 小于临界卡方值。据此, 我们接受 QC 值服从假定的 $\mu=207.6\text{ng/mL}$ 、 $\sigma=14.1$ 的正态分布这一假设。

表5 卡方和 t 分布的临界值¹⁾

df	单侧检验卡方值			单侧检验 t 值		
	0.05	0.025	0.005	0.05	0.025	0.005
1	2.71	3.84	5.02	6.31	12.71	63.69
2	4.61	5.99	7.38	2.92	4.30	9.92
3	6.25	7.81	9.35	2.35	3.18	5.84
4	7.78	9.49	11.14	2.13	2.78	4.60
5	9.24	11.07	12.83	2.02	2.57	4.03
6	10.64	12.59	14.45	1.94	2.45	3.71
7	12.02	14.07	16.02	1.89	2.36	3.50
8	13.36	15.51	17.53	1.86	2.31	3.36
9	14.68	16.92	19.02	1.83	2.26	3.25
10	15.99	18.31	20.48	1.81	2.23	3.17
11	17.28	19.68	21.92	1.80	2.20	3.11
12	18.55	21.03	23.34	1.78	2.18	3.05
14	21.06	23.68	26.12	1.76	2.14	2.98
16	23.54	26.30	28.85	1.75	2.12	2.92
18	25.99	28.87	31.53	1.73	2.10	2.88
20	28.41	31.41	34.17	1.72	2.09	2.85
25	34.38	37.65	40.65	1.71	2.06	2.79
30	40.26	43.77	46.98	1.70	2.04	2.75
35	46.06	49.80	53.20	1.69	2.03	2.72
40	51.81	55.76	59.34	1.68	2.02	2.70
50	63.17	67.50	71.42	1.68	2.01	2.68
60	74.40	79.08	83.30	1.67	2.00	2.66
∞	—	—	—	1.645	1.960	2.576

1) 表中数值用 SAS 系统生成。

正态分布理论能用于检验某一个特定的样本值是否与其他值或经验值相一致。如果已知均值 μ 和方差 σ^2 , 我们就能通过计算量 $Z=(x_i-\mu)/\sigma$ 并与标准正态偏差表相比较得到观察值 x_i 的偏离程度。假设 QC 样品的一个值是 170ng/mL , 经验告诉我们, 样品服从 $\mu=207.6\text{ng/mL}$ 、 $\sigma=14.1$ 的正态分布。如果 170ng/mL 这一数值符合分析方法, 操作得当且仅存在随机误差这一假设, 那么我们只需计算 $Z=(170-207.6)/14.1=137.6/14.1=-2.77$, 并从标准正态分布偏差表中得到从 ∞ 到 -2.77 这部分的比例是 0.0028。也就是说, 与均值偏差达到 $\pm 37.6\text{ng/mL}$ 的值出现的概率 $p=2 \times 0.0028=0.0056$ 。通常, 当一个观察值出现的概率小于 5% ($p<0.05$) 时, 我们就得质疑假设是否成立了。所以, 我们认为, 不是我们得到了一个罕见的观察值, 就是我们的分析方法不如预期的那样操作得当。观察值仅仅由于随机误差而偏离其期望值这一假设被称为零假设。如果零假设不成立, 我们就得接受所谓的备择假设, 例如在这个例子中, 备择假设就是我们的分析方法操作不当。

Z 检验同样能用于检验来自容量为 n 的样本的均值 \bar{x} 是否同已知总体均值 μ 一致。这一检验中, $Z=(\bar{x}-\mu)/(\sigma/\sqrt{n})$, 其中 σ/\sqrt{n} 是均值的标准误差。如同我们在确定是否接受 170ng/mL 这一 QC 值时一样, 这一统计量要通过标准正态偏差表进行评价。

需要指出的是, 尽管在检验中普遍使用 5% 的显著性 ($p<0.05$), 但这一值并不总是合适的。如果拒绝 170ng/mL 这一 QC 值使得我们去评价该分析方法对于特定的一批样品的分析结果是否得当, 那么 5% 这个值是合适的。在这一显著性时, 即使一切都正常, 我们也可能在 20 次中有 1 次舍去了正常值。这就会导致统计学上所说的第 I 类误差, 5% 限度通常不会有问題。不过, 如果拒绝 170ng/mL 这一 QC 值使得我们舍去了用于精确性和精密度估计中的数值, 那么这一错误地排除 5%, 而去计算最好的 95% 的估计值的做法通常就不被接受了。在这种情况下, 使用 1% ($p<0.01$) 或更低的显著性会更合适。在如此低的显著性情况下, 我们会拒绝更少的因随机误差而偏离期望值的数据。尽管这是符合要求的, 但在低的显著性条件

下检验同样会导致我们拒绝更少的真正由于分析方法问题而偏离期望值的数据。这种对真正异常值的忽略被称为第 II 类误差。一般来说,同时减小第 I 类和第 II 类误差的方法就是增加样本容量。

样本均值的分布

我们很少会知道总体方差,因此,我们必须通过一个样本进行估计。如果总体服从正态分布,或者是来自非正态分布的大样本,那么我们就能通过检验知道样本均值是否同已知的或是假设的均值相一致。为此,我们借助以学生 t 分布为基础的统计量。 t 分布由 Gossett 创立,前面用“学生”这一笔名,是来形容来自正态分布样本中均值的表现。 t 分布完全由样本容量 n 定义,或者更合适地说是由自由度 $n-1$ 来定义的。 t 分布的形态类似于标准正态分布,为钟形,不过峰较宽。随着样本容量的增大,分布趋于正态分布,当样本容量为无限时,与正态分布重合。统计量 t 的用法和 Z 一样,来检验一个样本均值是否同总体均值 μ 一致。两个统计量的不同之处在于, t 分布的 σ 由其样本估计值,即标准偏差 s 代替。统计量 t 为: $t = (\bar{x} - \mu) / (s / \sqrt{n})$ 。表 5 提供了不同自由度 ($n-1$) 下一系列 t 的临界值。注意,当自由度为无限时, t 的临界值就是标准正态偏差 Z 。

假设 QC 样本制备时含有 200ng/mL 某种药物,我们不知道总体方差。那么,一个基于 42 个测定值、均值为 207.6ng/mL 的样本,是否同真值 200ng/mL 相一致呢?这可以表述为零假设 (H_0) 和备择假设 (H_a):

$$H_0: \mu = 200 \text{ ng/mL}$$

$$H_a: \mu \neq 200 \text{ ng/mL}$$

由于总体 σ 未知,我们只能通过样本标准偏差 s 来估计。计算 $t = (207.6 - 200) / (14.1 / \sqrt{42}) = 3.49$ 。根据表 5,自由度设为与 $42-1=41$ 最接近的 40,我们得到在 0.005 显著性下一个临界的、单侧的 t 值: 2.07。如果计算得到的 t 值超过临界值 ($t > t_{\text{crit}}$) 或小于临界值的相反数 ($t < -t_{\text{crit}}$),则拒绝零假设 H_0 。在这个例子中, t 的计算值为 3.49,超过了临界值,我们拒绝在显著性为 0.01 (2×0.005) 水平时样本来自于均值为 200ng/mL 的总体这一假设。也就接受了制备 QC 样本的药物浓度不是 200ng/mL 这一假设。这是单样本 t 检验的一个例子。

t 检验的另一种用途是双样本 t 检验。这一检验用于确定两个样本是来自均值相同的两个总体 ($\mu_1 - \mu_2 = 0$) 还是均值不同的两个总体 ($\mu_1 - \mu_2 = c$)。在这两种情况下, $t = [(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)] / \text{se}$, 其中 \bar{x}_1 和 \bar{x}_2 是两个样本的均值。算式的分母 se 是两个均值差值的标准误差, $\text{se} = s_p \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}$, 其中, $s_p = \sqrt{[(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2] / (n_1 + n_2 - 2)}$, s_1 和 n_1 是第一个样本的标准差和样本容量, s_2 和 n_2 是第二个样本的标准差和样本容量。通过 t 表查得自由度为 $n_1 + n_2 - 2$ 时的 t 临界值,如果我们的计算值超出了临界值,或者小于临界值的相反

数,则应拒绝两个样本是来自均值相同或均值差为 c 的两个总体的假设。

假如我们有另一批 20 个来自另一个 QC 样本的 QC 值,预计同前一批的制备方法相同的,均值为 199.6ng/mL,标准差为 13.5ng/mL。我们可以确定这些结果是否同前一批的 42 个结果相一致。零假设是两批 QC 样品制备相同, $\mu_1 - \mu_2 = 0$; 备择假设就是 $\mu_1 \neq \mu_2$ 。标准误差 $\text{se} = [(41 \times 14.1^2 + 19 \times 13.5^2) / (41 + 19)]^{1/2} (1/42 + 1/20)^{1/2} = (193.566)^{1/2} (1/42 + 1/20)^{1/2} = 3.78$ 。

统计量 $t = (207.6 - 199.6) / 3.78 = 2.12$,在自由度为 60 的情况下查表 5,得到显著性为 0.025 的单边检验的 t 临界值为 2.00。备择假设只是认为两批 QC 样品不同,并不在乎谁高谁低,这一检验就是双侧检验。在显著性为 0.025 下的单侧临界值用于显著性为 0.05 的双侧检验。计算的 t 值超过了临界值,因此我们拒绝这两组 QC 样品制备相同这一假设。如果还有配制这两批 QC 样品的储备液,我们或许会分析他们的浓度是否相同。

t 分布也能用于估计两个样本在一组成对的检测中是否看似来自于均值相同的总体,或是同一个总体。成对的 t 检验能在我们想确定一个新培训的分析员与经验丰富的分析员的分析结果是否一致时用到。假设每个检测使用 7 个 QC 样品,我们得到如下的分析结果(新分析员,经验丰富的分析员): (12.6, 11.3), (3.46, 2.34), (25.4, 22.5), (10.3, 8.80), (5.89, 4.68), (16.4, 14.2) 和 (9.95, 8.20)。成对 t 检验处理各成对结果的差异(新分析员-经验丰富的分析员): 1.3, 1.12, 2.9, 1.5, 1.21, 2.2 和 1.75。差值均值为 1.17,标准偏差为 0.641。统计量 t 由差值均值除以标准误差(标准差/ \sqrt{n})得到,并将结果同自由度为 $n-1$ 时 t 的临界值相比较。在这个例子中, $n=7$ 对, $t = 1.17 / (0.641 / \sqrt{7}) = 7.06$,超过了显著性 0.05 (表 5 中单侧 0.025) 下自由度为 6 时 t 的双边临界值 2.45。我们认为两个分析员间存在不完全由随机误差引起的差异。该“新”的分析员还需要进行培训。

另一个有用的分布

二项式分布是一个经常用到的统计学分布。二项式分布用于处理二元结果,如投掷硬币(正面/反面朝上)、孩子的性别(男/女)或者确定一片药片是否通过检验(通过/不通过)。当遇到一系列相互独立的二元结果时,如多次投掷硬币或者确定 20 片药片各自是否通过检验,我们就会用到二项式分布。观察值在 n 次输出中出现 x 次的概率为 $C(x, n) p^x q^{n-x}$ 。从 $x=1$ 到 n 的二项式展开为 $C(0, n) p^0 q^n + C(1, n) p^1 q^{n-1} + C(2, n) p^2 q^{n-2} + \dots + C(n, n) p^n q^0$, 其总和为 1,因为至少观察到 1 次的概率为 1。展开式中符号 $C(a, n)$ 表示从 n 个不同样品中抽取 a 个为一组的不同抽法的总数: $n! / [a! (n-a)!]$ 。例如,从 4 个不同样品中抽取 3 个的不同抽法有: $C(3, 4) = 4! / [3! (4-3)] = (4 \times 3 \times 2 \times 1) / [(3 \times 2 \times 1)(1)] = 4$ 。需要指出的是,

T

0! 定义为 1。二项展开式中 p 是单个二元事件中观察值出现的概率, 如投掷硬币一次头像一面朝上的概率, q 则是单个二元事件中观察值不出现的概率, $q=1-p$ 。

综合运用

在生物利用度研究的血样分析中, FDA 要求各实验室在测定中包含三个已知浓度(高、中、低)的 QC 样品。每个浓度的 QC 样品都要做两个平行样。每批样品的通过标准建立在 QC 样本的分析结果上, 要求每六个值中至少有四个落在其标称浓度的一个特定范围内。同时, 三个 QC 浓度最多只能有一个超出通过标准。把二项式分布和正态分布结合起来, 就能估计出由于随机误差而拒绝通过的样品批数。

假设每个 QC 样品的通过标准是其必须落在标称浓度 15% 的范围内。任何符合此条件的样品就可通过, 而不符合的就被拒绝通过。一批基于多重二元输出的样品的通过检验的概率服从二项式分布。单一 QC 值未通过的概率等于其浓度落在标称浓度 85%~115% 之外的概率。浓度估计值假定服从均值为 100% 标称浓度的正态分布, 估计值的 Sigma 值等于分析方法的 CV 值。如果 CV=12%, 一个 QC 值符合通过标准的概率就是 Z 值从 (85-100)/12 到 (115-100)/12, 即从 -1.25~+1.25 的概率。-1.25~+1.25 间标准正态分布的比例为 0.7888, 也就是单一 QC 值的通过概率 p 。 $q=1-0.7888=0.2112$ 。有三种互斥的情况使得六个 QC 值中至少有四个符合通过标准: 六个都通过、六个中的五个通过以及六个中的四个通过。这些情况是互斥的, 出现其中一种情况, 就意味着另外的任何一种情况都不可能出现。这样, 六个 QC 值至少通过四个的概率就是这三种互斥情况下通过概率的总和。值得一提的是, 在概率计算中, 事件 A 通过任何一个互斥的事件 B, C, D 等发生, 那么事件 A 发生的概率为事件 B, C, D 等单独发生概率的总和。但是, 如果事件 A 的发生是由于事件 B, C, D 等都发生, 那么事件 A 发生的概率为事件 B, C, D 等单独发生概率的乘积。

根据二项展开式, 六个 QC 值至少有四个通过的概率为: $C(6,6)p^6q^0+C(5,6)p^5q^1+C(4,6)p^4q^2=1(0.7888)^6+6(0.7888)^5(0.2112)+15(0.7888)^4(0.2112)^2=0.8869$ 。不过, 对于一批样品的通过来说, 我们得加以额外限制, 就是当六个值中只有四个通过时, 未通过的另两个中最多只能有一个出现在同一 QC 水平(高、中、低)上。这一限制将六个中四个通过的情况由 15 种减少为 12 种, 从而将通过概率降低为 $0.8869-3(0.7888)^4(0.2112)^2=0.8351$ 。也就是说, 一批样品有约 83.5% 的概率通过, 而约 16.5% 的概率因随机误差而未能通过。我们或许会考虑提高分析的精密性而不是改变现有的导致我们错误地拒绝了将近 17% 的分析结果的分析方法。如果分析方法的 CV% 改善至 8%, 则批次通过的概率增加为 0.9875, 不通过率只有 1.2%。对于 42 批样品, 我们将返工 1~2 批, 相

比较而言, 12% CV 则需要返工 7 批。这是一个通过改进分析精密性获得丰厚回报的例子。

适合度检验中用到的卡方分布在另一个重要的统计学检验中也非常有用。假设经验告诉我们某一分析方法的 σ 不大于 10 ng/mL。在处理 42 批样品时, 得到的 QC 值的标准差是 14.1 ng/mL。这一结果和经验一致 ($H_0: \sigma \leq 10$)? 还是经验是错误的 ($H_a: \sigma > 10$)? 卡方检验能帮助我们找到问题的答案。这里用到的统计量 $\chi^2 = (n-1)s^2/\sigma^2$, 服从自由度为 $n-1$ 的卡方分布。我们的例子中, 算式中的 s 用样本标准差 14.1 代入, σ 用假设的上限 σ 也就是 10 代入, 单边检验计算为 $\chi^2 = (42-1)14.1^2/10^2 = 81.51$ 。计算值超过了显著性 0.005 下自由度 40 (近似 41) 时的临界卡方值 59.31。我们得出的结论是分析精密性降低了, 接下来或许还会调查其原因。

在药品生产时, 通常要从活性和非活性成分的混合物中采集和分析样品。这是为了检验混合物在经过加工步骤之前是否有足够的均一性。样本按照一定的规则从混合容器中采集, 例如从容器的顶层、中层、底层的左侧、中心、右侧采集。混合物均一性标准通常要求分析样本的均值落在产品标称值 (100%) 附近的一个合适区间 (如 95%~105%) 内。此外, 混合物样本分析的相对标准差 CV% 不能超过一个特定的界限 (如 5%)。运用正态分布和卡方分布的统计学原理, 我们能估计混合物均一性标准的通过概率。

假设事先知道产品混合物为标称的 97%~103%, 我们对于混合物“合格”的认定是其偏差不超过 3%, 这包括了混合物确实不均一、样本误差以及分析方法偏差。那么混合物合格的概率是多少呢? 对于混合物中的 9 个样本, 其均值的标准误差为 1%, 也就是单个测定中 CV 最差估计值 (3%) 除以采集样本数 (9) 的平方根。如果假设混合物的真实值是 97% (最差估计值), 那么 9 个混合物样本均值的观察值落在 95%~105% 这一接受范围的概率等同于 Z 值落在 (95-97)/1 和 (105-97)/1, 也就是 -2~+8 间的概率。-2~+8 标准正态分布比例为 0.977, 也就是混合物通过第一个标准的概率。第二个标准是 9 个样本的 CV 值小于 5%。对于 3% 的真实 CV%, 就是卡方值小于 $(n-1)5^23^2 = (8)(25)/9 = 22.2$ 的概率。在自由度为 8 的情况下, 卡方值小于 22.2 的概率大概是 0.996, 即通过第二个标准的概率。混合物通过的概率是两个标准通过概率的乘积: $0.977 \times 0.996 = 0.973$ 。因此, 在只存在随机误差的情况下, 有 97% 的混合物批次通过标准。

有人设想放宽通过范围 (如 90%~110%), 同时要求每个混合物样本都落在该范围中。这一标准是更松还是更严呢? 单一样本通过的概率, 是标准正态偏差 Z 落在 (90-97)/3 和 (110-97)/3 间, 即 -2.33~+4.333 的概率, 等于 0.99。若混合物通过第一个标准, 则第一个、第二个、第三个、直到第九个样本都要通过。通过第一个标准的概率为 $0.99^9 = 0.914$ 。综合第二个标准的通过概率, 得到混合物通过概率为 $0.914 \times 0.996 = 0.910$ 。仅 91% 的混合物能通过。尽管通过范围放宽, 不通过率由基于均值的 30 个



中的 1 个上升为基于个体值的 11 个中的 1 个。

最后一个分布

下面再介绍最后一个分布—— F 分布。 F 分布是统计学工具的重要补充。 F 分布用于检验两个方差估计是否一致。前面提到的基于 42 个测量值（自由度 41）的 QC 样本的标准差为 14.1 ng/mL。如果另一批 31 个 QC 值（自由度 30，或许是来自于另一个生物利用度研究）的标准差为

19.5 ng/mL。那么，我们可能想知道两个研究的分析精密度的否一致。方差比统计量为 s_1^2/s_2^2 ， s_1 是较高的标准差， s_2 是较低的标准差。将这一计算值与表 6 中自由度分子 $n_1 - 1$ ，分母 $n_2 - 1$ 的 F 分布临界值进行比较，在此情况下，显著性为 5% 的临界 $F_{30,41}$ 约为 1.74（表 6 中 $F_{30,40}$ 的最近似值）。计算 $19.5^2/14.1^2 = 1.91$ ，超过了临界值。那么，两次研究中的第二次的分析精密度的与第一次（精密度较低，CV% 较大）存在显著性差异（ $p < 0.05$ ）。

表 6 5%显著性下的 F 分布临界值¹⁾

DF ²⁾	自由度数																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	20	25	30	40	60	100	
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	243	244	246	248	249	250	251	252	253	
2	18.5	19.0	19.2	19.3	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	
3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.70	8.66	8.63	8.62	8.59	8.57	8.55	
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.62	4.56	4.52	4.50	4.46	4.43	4.41	
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00	3.94	3.87	3.83	3.81	3.77	3.74	3.71	
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.51	3.44	3.40	3.38	3.34	3.30	3.27	
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.22	3.15	3.11	3.08	3.04	3.01	2.97	
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.01	2.94	2.89	2.86	2.83	2.79	2.76	
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.85	2.77	2.73	2.70	2.66	2.62	2.59	
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.82	2.79	2.72	2.65	2.60	2.57	2.53	2.49	2.46	
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.72	2.69	2.62	2.54	2.50	2.47	2.43	2.38	2.35	
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.63	2.60	2.53	2.46	2.41	2.38	2.34	2.30	2.26	
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.57	2.53	2.46	2.39	2.34	2.31	2.27	2.22	2.19	
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.51	2.48	2.40	2.33	2.28	2.25	2.20	2.16	2.12	
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.46	2.42	2.35	2.28	2.23	2.19	2.15	2.11	2.07	
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.41	2.38	2.31	2.23	2.18	2.15	2.10	2.06	2.02	
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.27	2.19	2.14	2.11	2.06	2.02	1.98	
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.31	2.28	2.20	2.12	2.07	2.04	1.99	1.95	1.91	
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.13	2.09	2.01	1.93	1.88	1.84	1.79	1.74	1.70	
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.04	2.00	1.92	1.84	1.78	1.74	1.69	1.64	1.59	
50	4.03	3.18	2.79	2.56	2.40	2.29	2.20	2.13	2.07	2.03	1.99	1.95	1.87	1.78	1.73	1.69	1.63	1.58	1.52	
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.95	1.92	1.84	1.75	1.69	1.65	1.59	1.53	1.48	
100	3.94	3.09	2.70	2.46	2.31	2.19	2.10	2.03	1.97	1.93	1.89	1.85	1.77	1.68	1.62	1.57	1.52	1.45	1.39	
1	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.79	1.75	1.67	1.57	1.51	1.46	1.39	1.32	1.24	

1) 表中数值用 SAS 系统生成。

2) DF 为自由度。

F 分布广泛应用于方差分析 (ANOVA) 这一统计学检验。ANOVA 是检验来自正态分布或近似正态分布总体的样本均值一致性的有效工具。例如，假设有 4 批各 20 片药

片的数据：A 批均值 99.5%，标准差 2.6%；B 批均值 100.2%，标准差 2.8%；C 批均值 90.5%，标准差 2.1%；D 批均值 100.3%，标准差 2.7%。

T

是否有一批不同于其他批呢?要回答这个问题,我们需要进行统计学检验,零假设 $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu$ (所以均值都等于未知数 μ);备择假设 $H_a: \mu_1 \neq \mu$ 或 $\mu_2 \neq \mu$ 或 $\mu_3 \neq \mu$ 或 $\mu_4 \neq \mu$ (至少一个均值不等于其他一个或几个均值)。假设各批都具有相等的未知方差 σ^2 。统计量 F 包括计算两个方差估计 $s_1^2 = 1/(k-1) \sum n_j (\bar{x}_j - \bar{x})^2$ 和 $s_2^2 = 1/(N-k) \sum \sum (x_{ij} - \bar{x}_j)^2$ 。算式中, \bar{x} 是 $k=4$ 批的全体均值, n_j 是计算第 j 批均值 \bar{x}_j 的样本数 (每堆 20 个), $N = \sum n_j = \sum \sum n_{ij}$, 是 x_{ij} 值的总个数 ($20 + 20 + 20 + 20 = 80$)。 s_1^2 是每批均值同全体均值差别的合并方差, s_2^2 是个体值同每批均值差别的合并方差。如果分批不影响方差估计,那么仅由随机误差引起的方差比 s_1^2/s_2^2 为 1.0。 F 分布描述由于随机误差的存在,随意分批时方差比偏离 1.0 的程度。如果计算值超过表中临界 $F_{k-1, N-k}$ 值,那么均值相等这一零假设就不成立。

在我们的例子中, $\bar{x} = \sum n_j \bar{x}_j / N = (20 \times 99.5 + 20 \times 100.2 + 20 \times 90.5 + 20 \times 100.3) / 80 = 97.625$, $s_1^2 = (1/3) [(99.5 - 97.625)^2 + (100.2 - 97.625)^2 + (90.5 - 97.625)^2 + (100.3 - 97.625)^2] = 22.689$ 。因为每批 j 标准偏差的平方 $s_j^2 = \sum (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 / (n_j - 1)$, 则 $s_2^2 = (1/(N-k)) \sum (n_j - 1) s_j^2 = 1/(80-4) [19 \times 2.6^2 + 19 \times 2.8^2 + 19 \times 2.1^2 + 19 \times 2.7^2] = 69.0$ 。方差比 = $53.8/6.575 = 3.45$ 、显著性 5% 下, 临界 $F_{3,76} < 2.76$ 。2.76 是表 6 中 $F_{3,60}$ 值, 其分子自由度 (3) 和分母自由度 (60) 和我们需要的最为接近, 且并未超过 $N-k=76$ 。因为计算值超过了临界 F 值, 则各批均值相同这一零假设不被接受。我们接受 4 批中至少有 1 批的均值不同于其他 3 批这一备择假设。回去看这 4 批的均值, C 批看起来和其他的不同。

我们或许考虑过把每批的均值同其余各批均值成对进行双样本的 t 检验, 而不是通过 ANOVA 的方法, 来确定与其他批明显不同的那一批。这种方法是不可行的。首先, 这没有用到所有信息来计算分母合并方差估计; 其次, 这引入了所谓的多重比较问题。这一问题会在对同一组数据进行多次、独立的统计学估计时出现。当我们在显著性 5% 下进行一个单一的假设检验, 如 $H_0: A=B$ 时, 我们会在 A 确实等于 B 时在 5% 的情况下由于第 I 类错误而拒绝该假设。也就是说, 我们在零假设 $A=B$ 成立时, 作出正确判断的概率为 95%。在 ANOVA 法中, 对于 $A=B=C=D$ 的 F 检验也同样如此。如果我们独立地进行多次 t 检验, 如 $A=B, B=C, C=D, A=C$ 等, 那么对于每个显著性为 5% 的检验, 我们有 95% 的概率得到所有均值相等这一零假设成立的结论。要正确接受所有均值相等这一零假设, 必须同时证明 t 检验中 $A=B, B=C, C=D, A=C$ 等。这一概率为 $(0.95)(0.95)(0.95) \cdots (0.95) = (0.95)^n$, 其中 n 是进行 t 检验的配对比较次数。多次配对比较后拒真的概率为 $1 - (0.95)^n$, 在任何 $n > 1$ 时显著性都超过了 5%。在这种情况下, 存在 $C(4, 2) = 6$ 对比较。多次配对比较后拒真的概率为 $1 - 0.966 = 0.265$, 显著性为 26.5%, 而不是预期的 5%。因为这个原因, 我们仅在均值相同这一假设

被 ANOVA 拒绝时考虑成对检验, 这保持了预期的 5% 的显著性。

对于后 ANOVA, 即成对检验, 我们通过一些步骤来处理多次比较问题。其中之一是基于 1 和 $N-k$ 自由度的 F 分布。这一检验同样需要用到 ANOVA 中的 s_2^2 。统计量 $F = (1/s_2^2) [(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)^2 / (1/n_1 + 1/n_2)]$, 其中 \bar{x}_1, \bar{x}_2 分别为进行成对比较的两批 n_1 和 n_2 个值的均值。比较 A 批和 C 批: $F = (1/6.575) [(99.5 - 90.5)^2 / (1/20 + 1/20)] = 123.2$, 即使在 1% 显著性时也远远超过临界 $F_{1,76} < 7.08$ (由 $F_{1,60}$ 得到), 因此我们拒绝 A 批和 C 批均值相等这一假设。因为 B 批、D 批的均值和 C 批差别更大, 因此它们同样和 C 批在均值上存在统计学差异。相比之下, 均值分别为 99.5% 和 100.3% 的 A 批和 D 批, F 检验值为 0.97, 远远小于 5% 显著性下的临界值, 该临界值 < 4.00 。

这 4 批样品的检验是单因子 ANOVA 的一个例子。说是单因子是因为我们的数据只归在一类。很多情况下, 我们需要采取不同方法对数据进行归类。尽管我们的兴趣可能只是在于检验一个特定类别差异是否有意义, 不过同时考虑其他可能影响数据的归类方法也是很重要的。ANOVA 中每个不同类别都有一个零假设, 零假设认为该类别的不同项目的均值相等。如果拒绝零假设, 就等于接受备择假设, 即至少一个均值和其他的均值不同。这也说明了数据按照那种方法归类有特殊意义。

假设有两个分析员在测定来自生物利用度研究的血浆样本中的药物浓度, 用的是我们以前提到的分析方法。在分析前, 我们希望确定他们是否同等精通该分析方法。我们可以测试一下, 采用三个不同药物浓度的血浆样本。我们让每个分析员进行分析, 并在另一天重复一次。药物浓度测定结果可以归为三个不同类别: 分析员、分析日、样本。分析员变量有两个可能值: 分析员 1 和分析员 2。分析日有两个值 (分析日 1 和 2), 样本有三个值 (A, B 和 C)。这一结果的 ANOVA 是三因子的, 由这三个类别得名。我们所关心的是按照分析员的分类, 但是另外两种分类在确定实验进行情况时也是必须的。表 7 是实验结果。

表 7 两个分析员分析血浆样品情况的评价

样本	分析日	分析员 1	分析员 2
A	1	52.8	57.9
A	1	52.3	57.5
A	2	53.3	58.0
A	2	52.1	57.0
B	1	42.2	45.6
B	1	42.4	44.2
B	2	41.7	43.8
B	2	40.4	44.1
C	1	56.8	64.0
C	1	57.0	64.9
C	2	59.6	62.6
C	2	57.2	61.8



这个例子中的 ANOVA 计算是直截了当的，并且很容易推广到更多类别的情况。我们计算的第一个 ANOVA 量是修正因子 C 。 C 就是所有个体值的平方再除以所有个体数 N ： $(\sum x_{ijkl})^2/N$ ，其中 $i=1\sim 2$ （分析员）， $j=1\sim 2$ （分析日）， $k=1\sim 3$ （样本）， l = 每个分析员在每个分析日对每个样本的分析值 $1\sim 2$ 。表 8 显示了这一计算结果和其他 ANOVA 计算值。 A 的算法为个体值的平方和： $\sum x_{ijkl}^2$ 。每个类别的 ANOVA 值就是该类别每个项目的总数的平方和除以类别每个项目的个体数。在这个例子中，就是每个样本 A ， B ， C 的值的总数的平方和除以 8，8 是每个样本

的个体数（2 个分析员在 2 个分析日，2 个值）。ANOVA 的原理是将平方和 SS_{Total} 分成每个类别的平方和再加上随机误差： $SS_{\text{Total}} = SS_{\text{Analyst}} + SS_{\text{Day}} + SS_{\text{Specimen}} + SS_{\text{Error}}$ 。平方和通过两个 ANOVA 值的差 $A-C$ 计算。每个类别的平方和是其 ANOVA 值减 C 。随机误差的平方和 $SS_{\text{Error}} = SS_{\text{Total}} - SS_{\text{Analyst}} - SS_{\text{Day}} - SS_{\text{Specimen}}$ 。自由度也同样叠加： $df_{\text{Total}} = df_{\text{Analyst}} + df_{\text{Day}} + df_{\text{Specimen}} + df_{\text{Error}}$ 。总自由度就是所有个体数减 1。每个类别的自由度就是该类别个体数减 1。把每个平方和除以其自由度得到均方 MS ，为总体方差 σ^2 的一个估计值。

表 8 ANOVA 的计算

	总值	观测数	$\Sigma(\text{总平方})/\text{No.}$
所有 24 个值	1269.2	24	$C=67119.53$
第 1 和第 2 天	637.6, 631.6	12	$T=67121.03$
分析员 1 和分析员 2	607.8, 661.4	12	$K=67239.23$
样本 A、B 和 C	440.9, 344.4, 483.9	8	$R=68395.42$
		每个值的平方	$A=68541.24$

ANOVA 表的结构如表 9 所示。如果一类变量的方差估计 MS_{Variable} 严重偏离由随机误差得到的方差估计 MS_{Error} ，则该变量在不同水平具有相同均值的零假设不成立。换句话说，按照那种方式对数据进行归类说明了观察值的变动。我们通过方差比 $F=MS_{\text{Variable}}/MS_{\text{Error}}$ 进行检验，变量的自由

度等于分子的自由度，误差的自由度等于分母的自由度。如表 9 所示，我们拒绝两个分析员具有相同的分析样本水平这一假设。我们也发现，正如预期的那样，样本水平 A ， B ， C 并不相等。2 个分析日内的观察值没有明显的区别。

表 9 ANOVA 表

ANOVA 方差来源	df	SS	$MS=SS/df$	F 比
天	1	1.5000 ($T-C$)	1.5000	1.16
分析员	1	119.7067 ($K-C$)	119.7067	92.42 ¹⁾
样本	2	1275.8958 ($R-C$)	639.9479	492.51 ¹⁾
误差	19	24.6108 ($A-T-K-R+2C$)	1.2953	
总数	23	1421.7133 ($A-C$)		

1) 表示有统计显著意义 ($p<0.05$)。

在前面的例子中，我们检验了“相等”这一假设。事实上，我们的兴趣不在于相等，而在于“可比性”。我们通常不要求，甚至逻辑上不希望，两批同种药品具有完全相同的性质。如果有好几批同种药品，且每批中都有足够的数量（如 100~200 片）进行了分析，那么就能检测到批次间甚至 1% 的显著性差异。尽管存在显著性差异，这一差异实际上可以忽略。不过，我们要求药品的性质，如同分析员从事的分析一样，是具有可比性的。置信区间的计算可用于正态分布总体或任何样本量非常大的总体的样本均值的比较。首先，计算出分别来自两个总体的两个样本均值的差 $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ ，作为总体均值差 $\mu_1 - \mu_2$ 的估计。然后，计算这一差值的标准误差 $se = (s_p^2/n_1 + s_p^2/n_2)^{0.5}$ ，其中 n_1 和 n_2 是两个样本值的个数， s_p^2 是方差估计（ s_p^2 来自于 t 检验， s_2^2 来自于单因子 ANOVA 或 MS_{Error} ）。我们有 $(1-\alpha) \times 100\%$ 的置信度认为两个总体均值差的真值落在区间

$(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) \pm se \times ta/2$ ，其中 $ta/2$ 是 $\alpha/2$ 显著性下自由度与方差估计 s_p^2 相等时的临界单侧 t 值。

对于这两个分析员的 ANOVA 结果，自由度为 19 时， $MS_{\text{Error}}=1.2953$ 。分析员 1 的均值是 $607.8/12=50.65$ ，分析员 2 的均值是 $661.4/12=55.12$ 。均值差是 4.47。差的标准误差 $se = (s_p^2/n_1 + s_p^2/n_2)^{0.5} = (2 s_p^2/n)^{0.5} = (2 MS_{\text{Error}}/12)^{0.5} = (2 \times 1.2953/12)^{0.5} = 0.465$ 。95% 置信区间的临界 t 值是 0.025 显著性下自由度为 19 时的单侧 t 值：2.095。95% 置信区间是 $(-4.47) \pm (0.465)(2.095)$ ，或 $-5.44 \sim 3.50$ 。我们有 95% 的置信度认为分析员 1 的结果比分析员 2 运用相同分析方法的结果低 6.34% ($100 \times 3.50/55.12$) 到 9.88% ($100 \times 5.44/55.12$)。由于值 0 并不包含在 95% 的置信区间中，我们认为在 5% 显著性下两个分析员存在显著性差异，结论和 ANOVA 一致。不过，最大置信区间限 9.88% 不至于大到让我们否定这两

个分析员进行分析的可比性。这一结论并不只取决于 AN-VOA 的结果。

线性回归

熟悉分析方法的人也许也熟悉在数据点之间“作一条直线”。这一常用的统计学方法通常被称为线性回归法或普通最小平方法。即便是最简单的科学计算和电子制表程序都包含了在因变量 y (有随机误差) 和自变量 x (无随机误差) 的线性关系 $y = mx + b$ 中确定斜率 (m) 和截距 (b) 的方法。其统计学形式为: $y_i = mx_i + b + e_i$, 其中 e_i 为在特定的 x_i 值时得到的 y_i 值的随机误差。计算线性的方法很

简单, $m = [\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})] / [\sum (x_i - \bar{x})^2]$, $b = \bar{y} - b\bar{x}$, 其中 \bar{y} 和 \bar{x} 分别为所有 y_i 和 x_i 值的均值。对于每个 x 值对应不止一个的 y 值是很寻常的, 基本推测为每个 y_i 值的方差 (误差) 独立于其对应的 x_i 值。

正如以前所提到的, 确定一个血浆样本中某一药物的浓度需要建立一条校准曲线。该曲线通常是一条测量的响应比峰值 (y_i) 对应于测量浓度 (x_i) 的直线。样本中的药物浓度或者表观 (回推) 测量浓度从变换的校准曲线方程 (无误差) $x_i = (y_i - b) / m$ 得到。表 10 的前 5 列是标准曲线回推的一个例子。

表 10 校准曲线数据的线性回归分析

校准浓度 (x) / (ng/mL)	响应比 (y)	回推 ¹⁾ 计算/(ng/mL)	准确性/(%)	1/ x (x)	y/x (y)	回推 ²⁾ 计算/ (ng/mL)	准确性/(%)
0.250	0.321	0.134	54	4.000	1.285	0.253	101
0.250	0.311	0.123	49	4.000	1.244	0.242	97
0.500	0.545	0.373	75	2.000	1.090	0.490	98
0.500	0.59	0.419	84	2.000	1.178	0.537	107
1.00	1.042	0.902	90	1.000	1.042	1.02	102
1.00	0.994	0.851	85	1.000	0.994	0.967	97
5.00	4.981	5.10	102	0.200	0.996	5.20	104
5.00	4.466	4.55	91	0.200	0.893	4.66	93
10.0	9.911	10.4	104	0.100	0.991	10.4	104
10.0	9.247	9.65	96	0.100	0.925	9.73	97
25.0	24.132	25.5	102	0.040	0.965	25.5	102
25.0	22.448	23.7	95	0.040	0.898	23.8	95
50.0	44.061	46.7	93	0.020	0.881	46.7	93
50.0	51.171	54.3	109	0.020	1.023	54.3	109
100	101.132	108	108	0.010	1.011	107	107
100	88.314	93.9	94	0.010	0.883	93.7	94
250	227.438	242	97	0.004	0.910	242	97
250	241.472	257	103	0.004	0.966	256	103

1) 斜率 0.938; 截距=0.195;

2) 斜率=0.941; 截距=0.0834。

显然, 标准曲线的下端并不能提供给我们准确的浓度值, 这一问题在上端不存在。该问题体现了违背 y_i 值的方差相等这一假设会发生什么。在生物分析方法中, 随机误差最大部分是由体积误差引起的。我们经常会发现, 应变量 (y_i) 的标准差同浓度 (x_i) 成正比, 即 $e_i = kx_i$, 其中 k 是常数。这就违背了 y_i 方差相同这一假设。要纠正的话, 我们可以通过方差不变的转换实现。如果我们把线性方程除以 x_i , 得到 $y_i/x_i = m + b(1/x_i) + e_i/x_i$, $e_i/x_i = k$ 是一个常数, 使 y_i'/x_i 方差相等。当 y_i' 对 $1/x_i$ 回归时, 我们得到一条斜率等于预期截距 b , 而截距等于预期斜率 m 的直线。表 10 的后 4 列通过测量数据显示了这一变换如何

得到回推浓度的正确估计。方差不变的直线提供了同原始直线相差极小的斜率估计 (0.938→0.941) 以及相差较大的截距估计 (0.195→0.0834)。使用这一在很多高等回归方法中都用到的加权最小平方法能得到相同的结果, 其权重为 $1/x^2$, 并且更利于方差的稳定。

结论

前面叙述的方法有望为统计学在制药问题上的应用提供帮助。由于篇幅所限, 讨论仅局限于能假设为已知统计分布的情况 (参数分析)。现实生活中的数据不总是如此。

幸运的是, 制药科学家还能用很多非参数的、无分布的方法来对这类数据进行分析处理。掌握统计学方法的常识对于制药科学家来说是必要的。不过, 同样非常重要, 制药科学家得了解一个问题或实验设计何时需要请教统计学家。制药统计学家掌握了远远超过如前所述的那些基本方法的统计学工具。

参考书目

- Bolton, S. *Pharmaceutical Statistics*, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc. : New York, 1997.
- Brown, B. W., Jr.; Hollander, M. *Statistics: A Biomedical Introduction*; John Wiley & Sons: New York, 1977.
- Chatterjee, S.; Price, B. *Regression Analysis by Example*; John Wiley & Sons: New York, 1977.
- Dixon, W. J.; Massey, F. J., Jr. *Introduction to Statistical Analysis*, 3rd Ed.; McGraw-Hill Co.: New York, 1969.
- Draper, N. R.; Smith, H. *Applied Regression Analysis*, 2nd Ed.; John Wiley & Sons: New York, 1981.
- Kanji, G. K. *100 Statistical Tests*; Sage Publications, Inc. : Newbury Park, CA, 1993.
- Li, C. C. *Introduction to Experimental Statistics*; McGraw-Hill Co. : New York, 1964.
- Matthews, D. E.; Farewell, V. T. *Using and Understanding Medical Statistics*, 3rd revised Ed. : Karger AG: Basel; Switzerland, 1996, 5.
- Meyer, S. L. *Data Analysis for Scientists and Engineers*; John Wiley & Sons: New York, 1975.
- Snedecor, G. W.; Cochran, W. G. *Statistical Methods*, 8th Ed.; Iowa State University Press: Ames, 1989.
- SAS System. *Base SAS and SAS/STAT Software*; Release 6.12 TS060 for Windows SAS Institute, Inc. : Cary, NC, 1989—1996.
- Zar, J. H., Ed. *Biostatistical Analysis*; Prentice-Hall; Englewood Cliffs, NJ, 1974.

(黄 卓 译)





危险化学品和药品的处理

Antonio Conto

ChemSa fe Sas, Colletterto Giacosa (TO), Italy

引言

近几年来,人用和环境用化学品的安全法规已基本完善,制药公司和化学公司在生产、购买以及对化学品进行其他处理时必须遵守一定的法律。目前这些法规在所有国家都已执行^[1,2]。虽然美国与欧洲的标准在安全参数上还有一些差异,但就安全数据的认可,双方的意见是一致的。化学品安全性是通过大量国际评价机构的物理化学、毒理学、环境毒理学的研究而制定的。对此类化学品的风险评估正是基于上述研究的结果、化学品的使用以及化学品与人或环境接触的可能性^[3]。欧洲自从1981年就有了一套化学品标记与分类以及评估所谓的新的或已存在化学品的协调系统。在美国,化学品安全法规是由有毒物质管理委员会(TSCA)与联邦立法委员会(CRF)制定的^[4],并且由环境保护署监管。食品与药品管理局主要负责上市新药的注册。处理有害化学品的一个基本步骤就是对其进行分类与标记。分类标准列在安全数据表(SDS)中,这可提示操作者在处理化学品时可能的毒害与危险。处理有害化学品还必须参考职业性接触时限以及医疗救助指导,从而保证在发生意外泄漏与接触时得到急救。要正确地处理有害化学品,我们必须充分了解它[例如,参阅相关处理化学品的法规、人体毒性及相关危害的测试方法、可能的活性(活性主成分,API)、流行病学数据以及分类与标记]。药品是一类用于人类疾病治疗的化学物质,但是由于药品在生产过程中(生产、配方、包装等)是在一个相对封闭的环境中的进行的,因此更应考虑到工人与环境的安全。

本章将详细讨论化学品的安全问题,包括了药品安全领域,同时还将涉及有关纯化学品的许多建议和原则,从而使读者对这一问题有一个全面的了解。文中化学品和药物可互换使用,因为实际上所有药物本质上均是化学品。

定义

表1列出了一些定义,以便于读者理解。

表1 一些定义

化学品	天然存在的或人工合成的化学元素及其化合物,包括为了保证产品稳定而加入的添加剂以及制备中产生的杂质
有毒药物	本身有毒或与人接触或暴露于环境中有害的物质

续表

制剂	由两种或以上物质组成的混合物或溶液
上市	将物质供给第三方
NONS	新化合物通报
EINECS	欧洲已有化学品清单
ELINCS	欧洲已通报化学品列表
PMN	生产前通报 (USA)
USA OSHA	职业安全与健康局
USA NIOSH	国家职业安全与健康研究院
ICCA	国际化学联合会
HPV	最高生产量
QSAR	定量构效关系
LD ₅₀	实验动物半数致死量
NOAEL	未观察到副反应的浓度
NOEL	未观察到活性浓度
OEL	职业接触浓度
SDS	安全数据表
PPE	个人防护设备
API	主要活性成分
RA	风险评估

法规与要求

我们将参考两套新化学品的安全原则:美国原则与欧洲原则。

1. 美国原则

所谓的生产前通报(PMN)是由环境保护署通过有毒物质管理委员会执行的,早在1977年1月1日就已执行^[1]。对新化学品的通报流程与评估体系于1979年7月开始执行。所有进口到美国的化学品(包括医药中间体,因为从法规的观点看也是化学品)必须列入TSCA的新发明的化学物质的清单中,除非它们只是供研发使用的少量的样品。以下种类的产品允许限量通报:进口的或生产的新的化学物质年产量1000kg或低于1000kg的化学品、用于生产或处理瞬间成像或一次成像的化学物质,以及一些聚合物。

生产前通报方法还适用于已知化学品的新用途(明显新用途规定)开发。如果化学品已经列在清单上,并且仍



按已有的方式使用（非新用途规定），则可进行生产/进口。如果清单上没有，则要附上 PMN。在生产新的化学物质 90 天以前必须呈报 PMN。经历了 90 天的审核期后，同时生产者在生产开始的 30 天内上报开始事项（NOC）后，新化学品会添加到清单中。事项要求提供以下内容：化学文摘登录号、化学名称、分子式和结构式、商品名、光谱分析、杂质类型与含量以及用途。开始不要求实验数据，但是如果有效的数据，则必须提供实验数据。已有化学品（即已列入清单的）按照职业安全与健康管理局（OSHA）和国家职业安全与健康研究院（NIOSH）制定的标准进行分类和处理。

2. 欧洲原则

欧洲原则按化学品吨位（年产量或总产量）的不同，还需将毒理学、环境毒理学、物理化学性质的检测程序报告到欧盟市场。最后必须给出一份包括所有安全性数据、生产、保存、处理以及废弃处置的文件^[2]。

文件还必须给出对被检测样品分类与标记的建议，同时要有对人员以及环境危害的风险评估。ECC 准则 92/32 中 Annexes VII C、VII B 与 VII A 的通报标准作为标准程序（允许依照物质和物理化学性质做一些小的变动）；对于其余的标准（如 Annexes VIII），必须由所有欧洲权威机构对检测程序进行讨论并得到认可才能进行。显然，我们已经将物质的环境毒理学数据考虑在前一种标准检测程序之中了。

EU 准则 67/548 与其最新补充原则（EEC 92/32）将以下种类视为新品：①没有列入欧洲已通报化学品列表（EINECS）的种类；②不属于以下由特殊团体法定的种类，即药品（如活性成分）、农药、化妆品、杀虫剂以及食品添加剂。这些要求不包括正在进行研发或用于研发目的的产品（POPD）。

检测程序中动物的使用受到特别关注；已通报产品不允许进行新的检测程序，但两个申请者必须使用同一套毒理学数据。

已存在化学品由特殊的条例进行管理，该条例有一个优先产品列表系统^[5]。制剂采用一种理论方法进行分类标记，该方法是欧洲准则 45/1999 列举的各种成分的毒性数据为基础的^[6]。

化学品检测

对化学品毒性以及其对操作者可能产生的危害的实际评估是基于在动物实验获得的数据^[7,8]。但是考虑到动物使用的伦理问题以及将动物数据用于人的可靠性，这种方法尚有争议^[9]。经过多年的研究，已经有了大量已存在化合物的数据，并且这些数据库方便易得。然而还有许多化学物质的安全性还未分类，还需要进行许多实验。在过去的几年里，一些工业协会已经引入了用于化学物质检测的程序来弥补安全性指标不足的问题，这些程序就是 ICCA 和 HPV^[10]。而且一些新的理论工具如归类方法、定量构效关

系（QSAR）得以应用。这些方法正在进行验证，有望用于法规注册方面。

目前化学品毒性的检测项目包括以下研究：

- 口服、接触与吸入的急性毒性试验；
- 皮肤与眼的刺激试验；
- 皮肤过敏性试验；
- 致突变试验（主要为 Ames 试验与染色体变异试验）；
- 多剂量（亚急性和慢性）毒性试验；
- 致畸与致癌试验；
- 环境毒性试验；
- 致激素紊乱试验；
- 物理化学试验。

研究包括一系列的试验，从急性毒性试验到最重要的慢性毒性试验、致癌试验与致畸试验。

最后我们可以对该化学物质进行分类，并且制定相应的最合适的安全的操作方法。

试验的目的是得到一系列的毒理学参数，通过这些参数来进行化学物质的分类^[7]。最重要的参数有：

- LD₅₀，杀死 50% 试验动物所需的浓度，这由急性毒性试验测得。
- 皮肤与眼的刺激性以及过敏性。
- 未观察到副反应的浓度（NOAEL）与未观察到活性的浓度（NOEL），这由多剂量试验测得。
- 可能对人员与环境产生危害的固有物理化学性质。

通常，那些具有高毒性、高致敏性、致癌性以及致畸性的物质被认为对人有高度的危险，需要特殊的防护与安全措施。在有些情况下，可禁止它们在市场上流通或在化工企业中使用。

分类与标记

化学物质的分类主要是三个方面：物理化学性质、毒性与环境毒性。

基于当前的法规，化学物质的分类具体如表 2 所示，该表给出了相应的类别以及用于包装上表示类别所用的字母^[7]。

表 2 化学物质的分类

分类	字母
易爆	E
氧化剂	O
易燃	F
极易燃	F+
有毒	T
极毒	T+
腐蚀	C
有害	Xn
刺激	Xi
危害环境	N

接下来就是依照分类对化学物质进行标示,该标示必须包含所有相关的信息,从而让操作者知道该物质的危害,如表3所示。

表3 化学物质的标示

标示内容	解释
化学品名	化学名称
生产单位	详细地址及应急电话
符号	表明危险类型的法定图案(火焰或骷髅等)
字母	表2所提的定义危险类型的字母
危险说明	阐明危险(如R25,吞服有毒)
安全说明	防止意外接触情况(如S24,避免皮肤接触)
其他事项	如果需要说明

安全数据表

安全数据表是供操作者使用的文件,它包括了所有关于该化学品的信息,尤其是关于化学品的处理^[12]。安全数据表通常由大量表示特殊信息的图表组成。

表4为典型安全数据表的构成。

表4 安全数据表的构成

段落号	题名	包含内容
1	品名与生产单位	化学名,公司名称,负责人及应急电话
2	组成和成分	化学名称
3	危害性说明	根据检测结果阐明可能的危害
4	初步救治方法(FAM)	不同接触途径具体说明初步救治方法
5	灭火方法	依照记录的物理化学性质
6	意外防范措施	包括个人与环境的预防,清理方法
7	操作与储存	阐明如何操作与保存以及相应防护设备说明
8	接触控制/个人防护	如有数据,应包括TWA、TLV、OEL限度
9	物理化学性质	根据试验
10	稳定性与反应活性	如果有数据
11	毒理信息	根据试验
12	生态学信息	根据试验
13	废弃事项	废料再生/中和可能的方法等
14	运输信息	运输归类(UN号等)
15	法规信息	分类与标记
16	其他信息和声明	如果需要或公司需要

操作

对有害化学物质或药品的操作是上述要求的最终目的。很显然它由最终写入安全评估文件中那些不同的参数所决定。首先是该化学物质本身的危害性。正如前面所讨论的,这是通过一系列相应的试验得到的。然而仅有这些还不足以推测化学品对人产生危害的风险。一条简单的规律就是最终的风险是与人和化学物质的接触相关的。由此我们得出结论,合理的操作是尽量减少与化学品接触的概率,从而可以大大降低风险。与低毒性的化学物质长期接触比少接触或不接触高毒性的化学物质更危险^[7]。这就是说,操作/处理的过程是减少化学物质对操作者危害的关键因素,如果处理不当特别是长期接触后,会增加对人员的副作用,导致严重的健康问题。

关于这个问题,首先要认真考虑的是接触途径^[13]。对于细粉,吸入途径是影响人体健康最危险的方式,它会导致肺部的呼吸系统疾病、过敏,更严重者导致肺癌。其第二条途径毫无疑问是皮肤途径。该途径可以导致局部反应(刺激、皮肤炎症、红肿)或全身反应(中毒或过敏)。第三条途径是入口,这种情况一般比较少,但一旦摄入将会产生极大的毒性。一般企业中熟练的工人不会发生此类情况,而对那些可能意外误食的公众造成了毒性。

为避免上述接触,属于有害或有毒物质几乎在操作的全过程中,必须按照特殊的程序或配备个人防护设备进行操作。对于高毒性、高过敏性、致癌性、致畸性的化学物质,应该在一个完全密闭的空间或系统中进行操作,从而阻止任何可能与人接触的途径。

表5列出了通过不同途径接触后的初步救助方法(假设该化学物质有副作用)。

表5 不同途径接触后的初步救助方法

接触途径	PPE	初步救治方法
吸入	口罩,最坏情况下使用防毒面具	迅速转移,呼吸新鲜空气
皮肤	防护服,手套	立即脱去污染的衣服与鞋;用肥皂或中性洗涤剂彻底清洗污染部位,直到没有物质残留的迹象(15~20min)
眼睛	防护眼镜	立即用大量水或生理盐水冲洗;保持眼睑睁开
食入	口罩	如果尚有意识,用水冲洗口腔;对症治疗

如果在接触后数分钟内或急性暴露后即表现症状,此时就需要听取医生的意见。

医生应该根据表现的症状以及化学品上标注的信息来采取一切适当的治疗。

根据物理化学性质的不同,需要采用不同的操作方式,这主要与储存条件有关系。对易爆、易燃、易氧化的物质,

在标注、包装、储存和操作中必须特别注意。表 6 列出了根据物质性质采取不同的操作/处理方法。

表 6 与物质性质有关的操作/处理方法

性质	PPE	初步救助方法
易爆	防爆服	避免振动、摩擦与加热, 标明并储藏于通风处
易燃	防护服	远离火源; 标明并密闭放于控制地区, 禁止吸烟
氧化剂	防护服	禁止接触易燃物; 标明并密闭放于控制地区, 禁止吸烟

一旦化学物质被归类为对环境有一定的危害, 那么处理这些物质就有特殊的方法。不要使这些物质进入排水系统、地表水、地下水和土壤中, 因此储存必须严格控制。使这些物质释放到环境中是绝对不允许的, 必将受到地方/国家相关法规的制裁。

容器或清洗反应罐时的残渣必须妥善保管、标记, 并由专门的废物处理企业进行处理。一般高温燃烧是处置废物最好的方法, 应尽量减少废弃物的量。

化工厂必须在密闭的空间或系统中使用所有那些属于高毒性、高致敏性、致癌、致畸性的物质, 以防一切与人接触的可能。如果该化工厂有任何薄弱环节可能使化学品泄漏, 个人防护设备必须配置到位。

职业接触浓度

所谓的职业接触浓度 (OEL) 是针对药厂和化工企业的重要参数^[13,14]。OEL 的评定与应用对于在药厂常规操作的有危害的药物也特别重要。测定某个化学物质以及相关操作/使用的 OEL 有不同的方法。我们倾向使用这套方法, 它测定了所有表征一个化学物质危害性的可能的参数。

这套方法贯穿不同的过程:

一期: 通过动物试验测定 NOEL-NOAEL, 并且评估对健康人可能的影响。动力学/吸收数据也很重要。

二期: 收集所有可行的职业毒性报告, 特别注意接触途径。

三期: 进行流行病学数据调查 (上市后监测与工业卫生统计)。

四期: 提供恰当的好的安全因素。

五期: 根据以下公式计算 OEL:

$$OEL = [NOEL \text{ 或 } NOAEL \times 70 \text{ (50) kg (平均工人体重)}] / [\text{血清半衰期} \times \text{吸收百分数} \times 8\text{h 的呼吸} \times \text{安全因子}]$$

应该在化学品操作的整个过程中考虑 OEL 最终计算值, 特别是因操作和使用引起的可能的人体接触。

总结

我们从本章的内容可意识到, 有危害的化学药品和药品的处理是一个包括多个知识领域的过程。一个企业在试图

引入正式的产品 (原料、中间体或药物活性成分) 安全政策时, 需要建立一支由药学专家 (负责活性与流行病学数据)、工业毒理学专家 (负责分类)、医学专家 (负责健康相关事务) 以及管理专家 (负责意外发生时的法律责任) 组成的多学科团队。当然关键是工业毒理学专家, 因为他要根据各种试验解释毒性参数并且使之用于安全生产。大型企业通常都配备了工业毒理专家, 但是中小型企业很少配备这方面专家, 这些企业在不久的将来可能面临安全问题。

由于化学品安全性就是根据其本身的危害性、使用以及可能与人的接触制定的一份最终风险评估, 所以制定风险评估这个最后的环节越来越被权威机构重视。最终风险评估可以提示我们可能对人的危害风险, 并且当风险很大时采取合适的防护措施。

应尽力减少归类于高毒性、高致敏性、致癌或致畸性物质的使用。在可能的情况下, 如果有替代品, 应禁止其使用。

参考文献

1. Toxic Substance Control Act, January 1, 1977.
2. EEC Directive 32/92 (Seventh Amendment of EEC Directive 67/548), L154, June 5, 1992.
3. ECC Directive 67/93, L227, September 8, 1993.
4. Code of Federal Regulation, paragraph 21, USA.
5. EEC Directive 01/90, L146C, June 15, 1990, and EEC Directive 793/93, L84, April 5, 1993.
6. EEC Directive 45/1999, L200, May 31, 1999.
7. Klaasen, C.; Amdur, M.O.; Doull, J. Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons, 3rd Ed.; Macmillan Publishing Company; 1990; 902—916.
8. Tuffery, A. A. Laboratory Animals, An Introduction for New Experimenters; Department of Biological Sciences, NE Surrey, College of Technology; Ewell, Surrey, UK, 1987.
9. Willard, R.; Chappel, W. R.; Mordenti, J. Extrapolation of toxicological and pharmacological data from animals to humans. Adv. Drug Res. 1991, 20, 1—116.
10. Conto, A.; Gnemi, P. New initiatives for chemical safety. Chem. Mark. Rep. February 14, 2000, 257 (7).
11. EU Directive 59/2001, L225/1, August 6, 2001.
12. ECC Directive 91/155, L76, March 3, 1991.
13. Conto, A. In Classification of Drugs and Active Principles, Workshop on "Cross Contamination" organized by the Italian Pharmaceutical Association (AFI), Pomezia, Rome, February 8, 2002.
14. Libermann, D.; Lockwood, C.; McConeel-Meachen, M., et al. Barrier isolation technology, a safe and effective solution for providing pharmaceutical; development facilities. Pharm. Eng. July/August 2001, 21—30.

(谢 操 译)

微球技术及其应用

Diane J. Burgess

University of Connecticut, Storrs, Connecticut, U. S. A.

Anthony J. Hickey

The University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, U. S. A.

引言

一系列微球制备技术给用药的可控性提供了各种各样的可能。这里所说的“可控”包括对活性成分的保护和掩盖，减缓其溶解速度，使其便于运输，以及使活性成分具有靶向性。这种技术有利于：准确输送小剂量强药效药物；降低在靶组织或靶器官以外的其他部位的药物浓度；保护给药前后或到达作用部位前不稳定的化合物。

载药微球的性质是和所需治疗效果相关的，是由原料和给药系统制备工艺决定的。

药物载体颗粒可能调控着药物的体内行为。药物载体的性质对药物的清除动力学、组织分布、代谢以及与细胞的相互作用影响很大。改变药效可以增强疗效，但利用药物载体技术治疗疾病，需要详细了解载体与主要的细胞体系和器官的相互作用。就制剂的生产过程和稳定性而言，对给药系统的局限性也要有充分了解。现在很多材料可用作药物载体，包括免疫球蛋白、血清蛋白、脂质体、微球、纳米粒、微囊，甚至一些细胞也可以，如红细胞。

抗肿瘤药物^[1~5]、麻醉拮抗剂^[6]、甾体激素^[7,8]、促黄体生成激素释放激素的类似物^[9,10]、弹性蛋白酶^[11]以及其他一些大分子^[12]可制成微球。此外，疫苗、活细胞和组织也可以被包裹。

定义及概述

微球是一种近似球形的固体颗粒，粒径大小为1~1000 μm 。它由高分子材料、蜡质材料或其他可以对药物起保护作用的材料组成，这些材料包括合成生物降解聚合物、改性的天然材料（淀粉类、树胶类、蛋白质类、脂肪类和蜡质类）。天然聚合物包括白蛋白和明胶^[13,14]；合成聚合物包括聚乳酸和聚羟乙酸^[15,16]。

根据聚合物和药物的溶解性和稳定性，以及制备过程的安全性和经济因素，常选择适当的溶剂溶解聚合物材料。药物可以在制备过程中或通过随后吸附的方式以液态或固态形式存在于微球中（图1）。图1显示了两种形式的微球：一种是微囊型，药物被特殊的囊壳完全包裹；另一种是微基质型，药物分散在整个微球基质中。

微球粒径小，比表面积大。当微球粒径位于粒径分布较小端时有胶体的性质^[17]。微球的表面性质非常重要，常

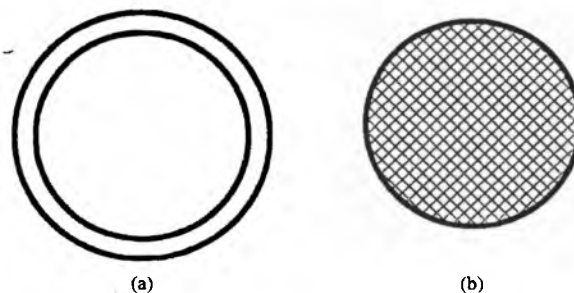


图1 微球示意图。(a) 由囊化的核组成的微囊；(b) 由药物均匀分散在颗粒中形成的微基质

常决定了它们的活性。实际上，微球制备的原理是依据界面的形成，包括形成界面边界的高分子材料交联的方法。下面所描述的制备方法虽然并不全面，但大家应该记住一点，如果遵循前面所说的原则，制备微球的唯一限制是研究者的想象力。

历史及前景

在微球内包裹微量药物的概念可追溯到20世纪30年代，Bungenberg de Jong和合作者们研究了将药物包裹于凝聚层中^[18]。包裹技术的第一个商业应用是美国国家收银机公司（National Cash Register Company）生产的无碳复写纸^[19]。在过去的几十年里，该项技术和应用已经有了很大发展，被用于农业、食品、家用产品、医药、制图和化妆品行业。

自从20世纪60年代开始，微球在制药行业中的潜在应用可能有以下几方面^[20~22]：

- 矫味和掩盖不良气味；
- 固化液态药物以便于应用；
- 保护药物免受外界环境的破坏（湿气、光、热、氧化）以及避免药物对机体的刺激（防止注射时的疼痛）^[23]；
- 延缓药物的挥发；
- 隔离不相容物（其他药物或辅料，如缓冲液）；
- 改善粉末的流动性；
- 使毒性大的药物应用安全；
- 有助于水不溶性药物在水性介质中的分散；
- 生产缓释、控释或靶向制剂^[24~27]；
- 和大的植入剂相比，减少突释的可能。

在医学上，微囊已被应用于活细胞和疫苗的包裹。通



过对人工培养的细胞和生物分子（如多肽、蛋白质和激素）进行包裹，可改善生物相容性，避免失活或排斥类等免疫反应^[28,29]。微球就如隔离材料，直到需要发挥它们生物活性时才使其起效。生物技术行业应用微球包裹生物体和重组生物体以有效地隔离它们^[30]。

药学上的应用

许多微囊化制剂是最近上市的，如阿司匹林、茶碱及其衍生物、维生素、胰脂肪酶、抗高血压类、氯化钾、黄体酮以及避孕激素类组合物^[31]。

使用氯化钾微囊（Micro-K，R. H. Robins 公司）可避免因使用氯化钾造成的胃肠道并发症。微囊具有可分散性，可控制离子的释放，从而降低了因氯化钾局部浓度过高而造成溃疡、出血或穿孔的可能。人们还发现微球还可用于注射剂^[32,33]或吸入剂^[34~37]。上市产品数量并没有反映出开展该领域研究的重要性，也没有反映出使用该技术所应达到的效益。经济因素是决定微囊制剂数量的关键因素。大多数包裹工艺成本昂贵，需要对设备进行大量投资，而用包衣锅包衣或喷雾包衣以及喷雾干燥投资较少，因为这些必要设备公司里一般可能都有了。另外需要在专利上出资，主要是因为大多微囊化工艺已受专利保护。

其他应用

微囊化在其他行业也有很多应用。最著名的微囊化产品是无碳复写纸、光敏纸、微囊化的香水，如“香水带”（snap-n-burst）和微囊化的香料（scratch-n-sniff）。所有这些产品通常都是通过凝胶和阿拉伯树胶复合凝聚制得的。Scratch-n-sniff 已经用于儿童书籍、食品以及化妆品香型广告宣传中^[38]。微囊也被广泛地用作诊断手段，例如，温度敏感性微囊用于探测肿瘤的温度变化^[39]。

在生物技术行业，用微囊化的微生物细胞生产重组蛋白质和多肽^[30]。将产品保存在微囊中可能有利于产品的收集和分离。包裹的微生物细胞可以增加生物反应器中的细胞装载量和产率。微囊越小，效果越好，因为较大的表面积对于通过微囊膜进行气体交换来说是很重要的。具有半透膜的微囊已用于细胞培养^[40]。用传统的细胞培养方法，猫科动物的乳腺肿瘤细胞系是很难生长的，而在微囊中培养已获得成功^[41]。活性炭微囊已用于血灌注^[29]。微囊在医学上的应用有含抗炎药物微囊的绷带^[25]。微囊化技术的独特用途是供给生物体营养。Sea bass 幼虫用全蛋白微囊或用含有脂质的微囊来供给食物，脂质可作为它们食物的一种补充^[42]。

微球制备

在微球的制备中，可控的最重要的理化指标有以下几点：

- 粒径及其分布；
- 聚合物的相对分子质量；
- 聚合物和药物的比例；
- 药物和聚合物的总质量。

这些指标中的每一个都可能与微球的制备以及药物的释放有关。下面我们将讨论微囊的制备（指包衣或包裹体系）和微球的制备（指均匀分布药物的基质体系）。

1. 蜡质包衣法和热熔法

蜡可以用于包裹颗粒，在熔融的蜡中通过溶解或分散的手段包裹药物。在高速搅拌下，将蜡状溶液或混悬液和冷的溶液（例如液状石蜡）混合，并持续搅拌至少 1h，然后将外相（液状石蜡）轻轻倒出，将微囊混悬在不溶解的溶剂中，空气干燥。很多乳液也可以用这种方法制备^[43]。例如热的水溶性药物溶液分散在熔融的蜡中形成 W/O 型乳液，再在热的外水相中乳化形成 W/O/W 型的乳液，然后将整个体系冷却，收集微囊。对于水溶性好的药物，非水相可以防止因药物溶解于外相而造成的损失^[44]。另外一种方法是当初乳加到外水相时快速降温。

用蜡包裹制成微囊虽然便宜且常用，但释药比聚合物的微囊要快。巴西棕榈蜡和蜂蜡可以用作包衣材料，为了得到理想的特性，常把它们混合在一起使用^[45]。用蜡包裹的微囊已成功制成片剂。直径 1~5 μm 的气溶胶颗粒可以由脂肪酸或石蜡蒸气中冷凝包衣制得^[46,47]。这样的颗粒在体外溶解速率下降，相应的在 Beagle 狗肺部沉积后的吸收速率也下降。

因为聚酸酐经表面溶蚀降解后形成无明显毒性的小分子，所以聚酸酐也被用于制备微球^[48,49,50]。将聚合物和活性物质混合后混悬在可混溶的溶剂中，加热到聚合物熔点以上 5 $^{\circ}\text{C}$ ，并不断搅拌，然后再冷却到熔点以下直至液滴固化，这样就得到了稳定的乳液。

2. 喷雾包衣法和包衣锅包衣法

喷雾包衣法和包衣锅包衣法使用热套管保温的包衣锅，在包衣锅中旋转固体药物颗粒并喷射包衣材料。颗粒的大小从几微米到几毫米，包衣材料通常以一定角度从一边喷射到包衣锅中，整个过程是连续的，直到均匀包衣完成，这是片剂和胶囊包衣的典型方法。

许多包衣的小颗粒具有比包衣片更安全、更一致的释放模式。另外不同批的微球可以有不同的包衣厚度，将它们混合可以得到特定的控释模式。

Wurster 法是一种对常用包衣锅包衣法的改进，该方法适合流化床制粒机^[51,52]。固体颗粒在压缩空气的作用下流化，溶解的囊材从流化室底部喷射到固体颗粒上，方向与空气流平行。此外包衣液也可以从上部或旁边喷到流化颗粒上，这适合于小颗粒的包衣^[53]。用流化床包衣技术包得的衣厚度比用包衣锅包衣要更均匀。用易燃的有机溶剂包衣会带来一些问题，因为在密闭的流化室中很可能发生爆炸，因此设计了防爆装置，然而在过去的 20 多年里开始

越来越多地使用水溶性包衣液。

水溶性包衣液包括水溶性低相对分子质量的纤维素醚^[54,55]、聚甲基丙烯酸酯的乳液聚合胶乳^[56]、水不溶性聚合物的分散体（如伪胶乳型的乙基纤维素）^[57]。这些无溶剂的包衣液可以包不同的衣，从快崩型的隔离衣到肠溶缓释衣都可以。Lehmann 已经对不同的包衣方法、包衣条件、各种包衣配方以及所使用的设备型号进行了综述^[58]。

3. 凝聚法

凝聚法是将大分子溶液简单分离成互不相溶的两种液相：一相是黏稠的凝聚相，这相是相对富集的大分子；另一相是稀的平衡相^[18]。凝聚层可以描述成液态结晶和中间相。只有一个大分子存在时，这种方法称为单凝聚法。当有两个或多个带相反电荷的大分子存在时，则称为复凝聚法^[18]。单凝聚法是由条件改变引起的，这种变化可导致大分子的脱水。单凝聚法可以通过加入非溶剂或微离子，改变温度等方法来实现，所有这些方法使聚合物间的相互作用超过了聚合物与溶剂间的相互作用。复凝聚法是由两个或更多大分子间的静电作用力造成的^[59]。

Bungenberg de Jong 等^[60]第一次阐述了固体颗粒也能包裹在凝聚体系中的观点。利用单凝聚法或复凝聚法靠相分离形成微小的凝聚层小滴，然后沉积或结合形成独立的凝聚相。凝聚层围绕着核形成，核可以是药物颗粒（图 2）。凝聚体系的搅拌可以避免小滴的合并和沉淀，采用加入戊二醛或加热的方法^[14,24,51,62]，小滴可交联形成稳定的微囊。Madan^[62]和 Nixon^[24]已对采用凝聚法制备药物微囊进行了论述。

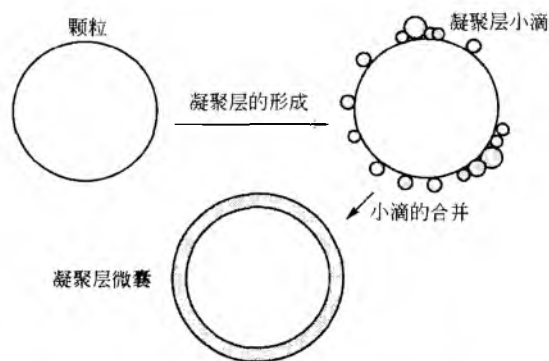


图 2 围绕核的凝聚层形成示意图

在复凝聚法中，有许多可变因素影响微囊的制备，包括 pH，离子强度，大分子浓度、比例和相对分子质量^[18,63]，结果产生了许多可控参数。利用选择这些参数可以制备具有特定性能的微囊。复凝聚法制得的微囊可制成混悬剂或凝胶剂^[64]，也可以混合在栓剂^[65,66]和片剂^[66,67]中。

尽管已经成功地制备了许多凝聚微囊系统，但还有许多局限性。它们只能在特定 pH 条件下才能形成，需要用交联剂或热辐射使其稳定，保持所形成的包囊则依靠交联

的程度。在某种程度上，pH 的局限性可以通过加入水溶性非离子型聚合物，[如聚环氧乙烷（即聚乙二醇）]加以克服^[68,69]。含有少量这样的聚合物可以在较宽的 pH 范围内实现微囊化。例如，使明胶和阿拉伯胶凝聚的 pH 范围可以从 pH 2.6~5.5^[63]扩大到 pH 2~9^[68]。此外，对于像明胶、羧甲基纤维素和乙烯马来酸酐共聚物这些大分子，已经证实了聚合物可导致单凝聚。在水溶性非离子型聚合物的存在下，简单凝聚的 pH 范围也扩大了。例如，明胶的简单凝聚 pH 范围从接近等电点时的 pH 扩大到 pH 5.5~9.5^[68]。

凝聚层的交联对稳定凝聚层乳滴和形成微囊是必要的。化学交联剂和热辐射可能会破坏凝聚层材料，如热不稳定和化学不稳定的药物及活细胞。Burgess 和 Singh 已经开发了一种稳定的凝聚层体系，它们不使用化学交联剂或热辐射^[70,71]。这种体系可能有助于蛋白质、多肽药物以及不能使用交联工艺的其他药物的转运。

4. 海藻酸钙微囊

将海藻酸钠溶液滴加或喷射到氯化钙溶液中可以制备微囊。二价钙离子和海藻酸交联形成凝胶化的小滴，这些凝胶小滴加到聚赖氨酸溶液中可以形成永久的交联。Lim 和 Sun 开发这种方法是为了包裹活细胞^[72]。人们对这种方法进行调整以满足不同聚合物的使用。甲壳素有比海藻酸更好的生物相容性而深受欢迎^[73]。传统的海藻酸盐小珠是将海藻酸盐溶液用细孔吸管滴加到氯化钙溶液中制得的，由于小滴直到临界质量时才会掉下来，因此小滴相对还是较大的。用泵将海藻酸盐从吸管中泵出可以形成较小的液滴，振动系统有助于小滴从吸管末端掉下^[72]，空气雾化法也可以形成较小的液滴^[74]。

5. 喷雾干燥法

喷雾干燥法是一种在密闭体系中一步形成微囊的生产工艺，适用于各种材料，包括热敏性材料。由于生产企业常常有该工艺所需的必要生产设备，因此这种工艺常被商业化应用。由于该工艺过程在密闭体系中进行，对 GMP 和无菌产品生产是非常理想的。药物和聚合物包衣材料用适宜的溶剂溶解（水性溶剂或非水性溶剂），或者将药物混悬于聚合物溶液中，另外也可以溶解或混悬在乳液或凝聚层体系中。例如，生物降解聚丙交酯微囊可以将药物和聚合物溶解在二氯甲烷中制得^[75]。甲基纤维素和羧甲基纤维素的喷雾干燥微球可以通过将聚合物溶解在水性体系中制得。微球的大小可以通过喷射速度、聚合物药物溶液的供给速度、喷嘴的大小、干燥室和收集室的温度以及这两室的大小来控制。加入增塑剂可以改善喷雾干燥制得的产品质量^[76]，增塑剂促进了聚合物的凝聚和膜的形成，并提高所形成微囊的圆整性和表面光滑性。

6. 溶剂挥发法

溶剂挥发法是微球制备中最新的一种方法。聚合物和

药物须溶解在有机溶剂中,常用二氯甲烷作溶剂。含有药物和聚合物的溶液分散在水相中形成小液滴,连续搅拌并升高温度使挥发性有机溶剂大量从小液滴中挥发,固化的聚合物-药物颗粒混悬在水相中,最后将这些颗粒滤出。图3是用该方法制得的聚乳酸颗粒^[77]。

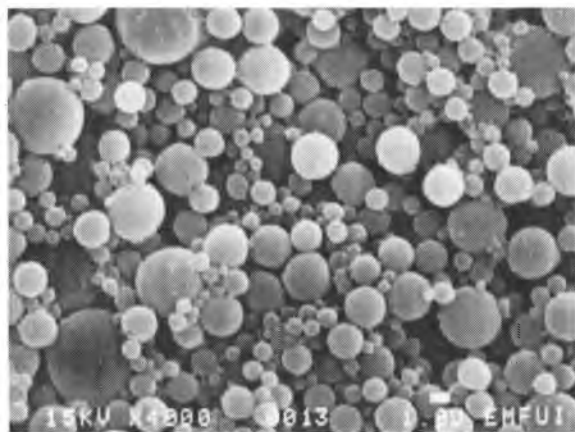


图3 采用溶剂挥发法制备的聚乳酸微球的扫描电镜照片(放大倍数 $\times 4000$)

7. 沉淀法

沉淀法是在挥发法基础上的一种改进。乳液是由分散在非极性介质中的极性小液滴组成的^[78],使用助溶剂可以将溶剂从小液滴中除去,聚合物-药物浓度的增加引起聚合物-药物沉淀从而形成微球的混悬液。

8. 冷冻干燥法

冷冻干燥法包括乳液的冷冻^[78]。连续相和分散相的相对凝固点是很重要的。连续相溶剂通常是有机溶剂,在低温低压下可升华除去。最终小液滴的分散相溶剂被升华除去,剩下的则是聚合物-药物颗粒。

9. 化学和热辐射交联

由天然聚合物组成的微球是用交联的方法制得的,天然聚合物有明胶、白蛋白、淀粉、右旋糖酐。在制备的W/O乳液中,水相是含有药物的聚合物溶液,油相是适宜的植物油或是含有油性乳化剂的油性有机溶剂混合液。一旦形成理想的W/O型乳液,水溶性聚合物就可以用某种交联方法固化,包括热处理方法和加入化学交联剂的方法,例如,在白蛋白中加入戊二醛以形成稳定的化学交联^[80]。如果使用化学交联或热辐射交联,那么化学交联剂的量、热辐射的时间和强度在决定微球的释药速率和溶胀性方面起关键作用^[79]。如果用戊二醛作交联剂,则残留的戊二醛可能引起毒性。

纳米粒

纳米粒是直径为10~1000nm的聚合物颗粒,同样可以

由制备微球用的天然或合成可生物降解聚合物制得^[81~83]。白蛋白纳米粒可以用前面所提到的交联方法制得。对于由合成聚合物组成的颗粒制备,常采用悬浮聚合、乳液聚合和胶束聚合的非均相本体聚合工艺。

水不溶性液体单体和药物的悬浮聚合可以在连续水相中通过搅拌小液滴分散体的方法得到,所得到的纳米粒直径为10~1000nm^[84]。该过程中温度必须严格控制。在小液滴中常使用引发剂以加快反应速率,水相中可以含有防止凝聚的稳定剂和增加黏度的增稠剂。单体官能团的反应生成聚合物,这种方法的优点是连续相吸收聚合反应产生的热量使微滴中的温度变化很小。然而当混悬颗粒中聚合物分子结合时,可能发生颗粒的聚集。令人感到遗憾的是为了避免凝聚而加入的稳定剂和其他添加剂很难从最终产品中除去。

乳液聚合时,液体单体要在水相中分散形成直径为0.05~5nm的小液滴^[85~88]。水相中要加入引发剂和表面活性剂,而且表面活性剂的浓度要高于其临界胶束浓度,过量的表面活性剂分子形成胶束并使其溶胀,在胶束疏水的内部可溶解部分单体。引发剂的自由基扩散进这些溶胀的胶束中并开始发生聚合。随着单体的消耗,从乳化的微滴到胶束内部,剩余单体的扩散速率逐渐减小。聚合反应进行时,胶束持续膨胀。增大的表面争夺可用的表面活性剂,因此影响了参与聚合反应的可用胶束的数量。在低温条件下这种方法制得的颗粒很小,且数量不多,但是通常颗粒中可能残留较高浓度的有毒单体。

胶束聚合不同于乳液聚合,因为单体和药物全部被包裹在由表面活性剂构成的胶束中。外相的非溶剂阻止了单体从胶束中扩散出来,因此聚合反应进行时颗粒大小的增加是可以忽略的。

表征

1. 材料

用于制备微球的聚合物必须按相对分子质量和纯度来表示其特性^[89~91],但这超出了我们所讨论的范围。这些材料的特性可能和微球的形成相关。应该了解所使用聚合物的黏性和成膜性,黏性可能影响微球的成球性、粒径甚至形状。Burgess和他的合作者指出,如果凝聚相的黏度太高,在某些pH和离子强度条件下白蛋白-阿拉伯胶不能形成微囊^[70,92]。Burgess和Carless建立了一种根据两种聚合物所带电荷预测复凝聚所需最适宜条件的方法^[63]。

2. 微球

微球大小可以用不同的方法来表征,包括光学显微镜、电阻抗技术(Coulter分析)、遮光技术、光散射技术、激光衍射分析。对于粒径小于1 μm 的颗粒,可以用光子相关光谱。电子显微镜、扫描电子显微镜和扫描隧道显微镜可用于观察微球的表面特性。如果表面有一些未被包裹的物



质或其他一些污物存在, 可以用 Fourier 变换拉曼光谱或 X 射线光电子光谱进行检测^[93,94]。其他一些表面表征技术包括用电泳进行表面电荷分析。表面电荷可以提供关于微球聚集的信息^[14,95], 它是关于体内微球相互作用的重要参数^[96]。

在包裹、润湿和用包衣材料包裹丸芯物质的黏附方面, 表面作用力很重要。常用测定接触角评价不同液体对固体的润湿性^[97,98]。当丸芯物的润湿性差时, 就很难或不能形成微囊。例如, 溶解在四氢呋喃-环己烷中的 Eudragit RS 不能使活性炭颗粒成囊, 但能使重铬酸钾成囊^[99,100]。油滴的表面疏水性已经被证明会影响它们吸收进入复凝聚的小滴^[101], 油的吸收直接和小滴界面的亲水亲油平衡值 (HLB) 相关。改变表面性质的添加剂如表面活性剂可影响丸芯材料的吸收。

3. 生物学分布

关于进入体内微球的处置已有深入研究。微球用放射性元素标记, 通过闪烁计数法或闪烁扫描法来研究其分布^[23]。由于颗粒大小的作用, 这项工作主要集中在组织分布研究, 结果发现粒径小于 $7\mu\text{m}$ 的趋于集中在肝脏的网状内皮组织系统中, 而粒径在 $7\sim 15\mu\text{m}$ 的颗粒趋于集中在肺的毛细血管系统中^[77]。各种微球的急性毒性^[102]、组织相互作用^[103~105]、细胞相互作用^[106~108]和蛋白质相互作用^[109]已经被研究, 结果表明微球的毒性是和剂量以及微球大小有关。服用微球后的初期炎症反应是和观察到的中性粒细胞及巨噬细胞出现吞噬作用相一致的。微球影响不同种类细胞和组织的程度可能和所用聚合物的表面性质及粒径有关。例如, 已经证实和聚 DL-丙交酯微囊结合的纤维蛋白原影响了表面电荷的性质^[104]。这种现象和表面疏水性有关, 实际上亲水性包衣能减少肝脏和腹膜巨噬细胞对微球的摄取^[110~112]。

治疗上的应用

1. 靶向

用微球和其他胶体载药系统可以使药物在体内靶向特定部位。在本书其他章节有关于胶体输送系统靶向的论述^[17]。微球靶向可以是被动靶向、主动靶向、转移靶向或物理靶向。在被动靶向中微球遵循体内的自然分布 (依据粒径、外形、表面性质、颗粒的形变和给药途径)。在主动靶向中改变了微球的自然分布 (如连接有定位导向剂, 像单克隆抗体和外源凝集素)。转移靶向也就是阻断微球的自然分布, 例如, 部分或全部削弱网状内皮组织系统的细胞功能, 否则这些细胞能吞噬微球。物理靶向指在外部影响下实现靶向, 例如, 通过改变温度或磁场来引导微球到达指定部位。

靶向程度可通过将药物集中到体内特定区域、特定器官 (如肺部)、细胞的特定族 (如 Kupffer 细胞), 甚至细胞

内结构 (如溶酶体或细胞核) 来实现。非肠道给药后, 与引导微球到达体内特定部位相关的问题在本书的“胶体与胶体药物输送”一章中讨论^[17]。

用微球也可实现口服靶向。研究发现粒径小于 $10\mu\text{m}$ 的靶向派伊尔结^[113], 小于 $5\mu\text{m}$ 的微球通过淋巴转运到巨噬细胞内, 大于 $5\mu\text{m}$ 的微球则留在派伊尔结^[113]。口服内毒素疫苗微囊后, 有效地在脏淋巴组织中转运并释放^[114]。

2. 控释

从微球中释药的速度决定了它们的治疗作用。释放是由药物和聚合物的分子结构、聚合物对降解的抗性、表面积以及微球的多孔性所决定的^[16,115,116]。储库型输送系统延长了药物在全身循环的停留时间, 开始时关注其零级溶出动力学特性, 血浆中药物浓度和时间呈线性关系。理想情况是大部分溶出时间内血药浓度与时间无关, 在治疗窗内维持最佳血药浓度。

在多孔聚合物体系中, 释药速率受给药装置的表面积控制, 表面积和形状直接相关。现已有对从不同几何形状的聚合物体系中释药情况的描述^[117]。片状或棒状的比球形的更容易达到零级释放。球形的释药速率可能源自聚合物的扩散或溶蚀^[116,118,119]。已经对扩散控制的释放进行了深入研究, 可用数学方程来描述它^[120,121]。

微球的内部结构可能因为所用微囊化工艺的不同而不同^[122]。储库型微囊有一用聚合物包裹药物的核。在完整的微球中, 药物均匀地分散在整个聚合物骨架中。

用药物从聚合物辅料中扩散的方式来实现对药物从微球中释放的控制, 当聚合物溶蚀时包裹的药物开始扩散, 并从聚合物微球的孔道中释放出来。如果药物从没有被溶蚀的聚合物中扩散出来, 那么释药和微球的表面积以及药物转运到外周环境中的通道长度有关。例如, 用减小粒径的方法增加表面积, 从而可以导致释药速率的加快。骨架中药物迁移长度可以通过调节微球的载药量来控制。载药量高的微球比载药量低的释放活性成分的速度要快。药物和辅料的理化性质 (如相互的渗透性、聚合物的特性、结晶度、增塑剂和填充剂的内含物、聚合物的浓度) 会影响药物的释放速率。

2.1 储库型微囊的释药

影响药物释放的因素可以用对最简单系统 (储库型微囊) 的释药研究来阐明。从这样的结构中药物扩散不仅包括穿过各向同性介质的转运 (如溶液中的药物), 还包括穿过聚合物膜的转运。穿过聚合物膜的药物转运包括在膜高浓度一侧聚合物中药物的溶解和在降低药物浓度作用下的跨膜扩散。此外, 药物转运的驱动力是膜两侧的浓度差, 当膜低浓度一侧的药物溶解度降低时, 浓度差也趋于减小。因此, 溶解性差的药物的溶解速率可能是限制药物释放的重要因素。

设想一球型储库型装置, 该装置中核心物质的热力学

行为是不变的,包衣层是惰性、均一旦厚度均匀。从 Fick 定律推出稳态释药速率为

$$\frac{dM}{dt} = 4DKc \frac{r_0 r_1}{r_0 - r_1} \quad (1)$$

式中: r_0 、 r_1 分别为外、内半径; D 为药物的扩散系数; K 为分配系数; c 为包衣层两侧的浓度差。假设方程 (1) 右边的所有参数保持恒定,要是核心物质的活性不变,那么 c 也不变。方程 (1) 对稳态期积分表明药物是以零级释放。因为药物必须穿过的膜是厚度均匀的,用转运距离和表面积保持恒定可以解释这种释药行为。但如果核心物质的热力学行为不是恒定的,那么药物就以一级释放。

在释药速率方面,考虑边缘效应也许是必要的。在给药装置表面上较高药物浓度的边缘层会阻碍药物通过扩散释放。在给药装置中溶解度低的药物和有不规则表面的微粒会使边缘层的影响更明显。从这个简单例子可以发现,各种因素都影响储库型微粒的释放速率。

2.2 完整微型骨架的释药

在完整微球中,药物的转运距离不是固定的,因为中心的药物比靠近表面的药物转运距离长,因此药物释放速率随着时间成指数下降。

然而,完整的微球能使药物以近似恒速释放^[117,123]。为了形成类似于储库型微囊的结构,可以增加微球核心的载药量。制备由最合适的颗粒大小(粒径分布)组成的联合体使其达到恒定的药物释放速率。用溶蚀性聚合物制备同时具有最大溶蚀与最小扩散的微球可以使释药速率恒定。尽管这些理论讲起来简单,但用起来很难,因为和很多因素有关,每一个因素都可能使工艺复杂。

3. 活细胞的包裹

微囊已经作为潜在的人造细胞(1964年 Chang 第一次阐述^[124])和固定活细胞的方法^[72]被研究。人们研究了人造细胞可能的医学应用,如人造肝脏、人造肾脏和红细胞的代替品。活细胞的包裹已作为无免疫排斥的组织移植方法被研究。因为抗体会引起移植细胞的排异或损伤,为了使高相对分子质量的抗体不能透过,但对于小分子如氧气、营养物质和在内部产生治疗作用的药物(如激素——胰岛素)是可以透过的,包裹的膜必须是半透性的。包裹过程必须对细胞没有损害并且无苛刻的条件,如在包裹过程中不使用有机溶剂和加热。最终的微囊必须是无菌的、稳定的和可生物相容的。哺乳动物的细胞包裹比微生物细胞包裹要难,因为哺乳动物的细胞膜更易破,并且在包裹过程中必须注意保护。温度、pH、离子强度和溶剂试剂的毒性要严格控制。活细胞微囊化的通常方法是在保护凝胶中包裹细胞,在凝胶滴周围形成永久性的膜。Lim 和 Sun 建立的海藻酸钙凝胶法已经成功用于哺乳动物的细胞^[72]。人们设计了一种微囊化系统^[125,126],该系统既具有易于设定海藻酸盐性质的特点,又具有水凝胶聚合物的稳定性和生物相容性,包括海藻酸-HEMA 接枝共聚物。

固定化胰岛能响应外界葡萄糖浓度并释放胰岛素到全身循环^[72]。大量动物研究表明,海藻酸-聚赖氨酸包裹的胰岛在两到三周时间内成功地改善了大鼠的糖尿病症状^[127]。

固定化细胞也被用于生物技术生产蛋白质分子。例如,被包裹的杂交瘤细胞已被用于单克隆抗体的生产中^[30],将单克隆抗体包裹在微囊中,这样相对于在培养基中直接生长杂交瘤细胞更容易收集抗体。微囊容易从培养基中分离,并容易破囊以收集抗体。从培养基中分离抗体有很多纯化步骤,而且每步产品都有损失,损失的程度和处理效率有关。活疫苗也可被包裹。例如,卡介苗被包裹在海藻酸盐聚赖氨酸-海藻酸盐系统中^[74]。

灭菌

用于注射的微球必须是无菌的。无菌操作通常可以达到灭菌的目的。成品不能经受最终灭菌,最终灭菌会破坏输送系统,改变释药模式,或者破坏靶向性。另外,包裹的药物或生物活性物质不能耐受灭菌所需的热量。尽管微球外部的无菌情况可以用平皿接种法加以考察,但考察微球内部是否不受细菌污染就很难了。微球可以被破坏,但这种方法可能引起假阴性或假阳性结果。现在已经建立了一种不破坏微囊的检测方法,这种方法对存在于微球系统内部活生物体的新陈代谢进行检测^[128]。

当微球作为商品上市时,灭菌是许多必须被提到的方面中的一个^[129]。最有效地实现产品开发就是要处方和工艺设计同时进行。作为药物转运系统,关于微球工业化生产的出版物很少。

参考文献

1. Fujimoto, S.; Miyazaki, M.; Endoh, F.; Takahashi, O.; Shrestha, R. D.; Okui, K.; Mori-moto, Y.; Terao, K. *Cancer* 1985, 55, 522—526.
2. Gupta, P. K.; Hung, C. T.; Perrier, D. G. *Int. J. Pharm.* 1986, 33, 137—146.
3. Gupta, P. K.; Hung, C. T.; Perrier, D. G. *Int. J. Pharm.* 1986, 33, 147—153.
4. Gupta, P. K.; Lam, F. C.; Hung, C. T. *Int. J. Pharm.* 1989, 51, 253—258.
5. Jones, C.; Burton, M. A.; Gray, B. N. *J. Pharm. Pharmacol.* 1989, 41, 813—816.
6. Schwoppe, A. D.; Wise, D. L.; Howes, J. F. *Life Sci.* 1968, 17, 1877—1886.
7. Gardner, D. L.; Patanus, A. J.; Fink, D. J. *Steroid Release from Microcapsules. Drug Delivery Systems*; Gabelnick, H. L., Ed.; DHEW Publ. No. (NIH), 77—1238. Department of Health, Education, and Welfare; Washington, 1977; 265—278.
8. Anderson, L. C.; Wise, D. L.; Howes, J. F. *Contracep-*





- tion 1976, 13, 375—384.
9. Kent J. S.; Lewis D. H.; Sanders L. M.; Tice T. S. U. S. Patent 4675189, June 23, 1987.
10. Sanders, L. M.; Kent, J. S.; McRae, G. I.; Vickery, B. H.; Tice, T. R.; Lewis, D. H. *J. Pharm. Sci.* 1984, 73, 1294—1297.
11. Martodam, R. R.; Twumasi, D. Y.; Liener, I. E.; Powers, J. C.; Nishino, N.; Krejcarek, G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979, 76, 2128—2132.
12. Rhine, W. D.; Hsieh, D. S. T.; Langer, R. J. *Pharm. Sci.* 1980, 69, 265—270.
13. Yapel A. P. U. S. Patent, 4 147 767 Apr. 3., 1979.
14. Burgess, D. J.; Carless, J. E. *Int. J. Pharm.* 1986, 32, 207—212.
15. Redmon, M. P.; Hickey, A. J.; DeLuca, P. P. *J. Contr. Rel.* 1989, 9, 99—109.
16. Lzumikawa, S.; Yoshioka, S.; Aso, Y.; Takeda, J. J. *Contr. Rel.* 1991, 15, 133—140.
17. Burgess, D. J. *Colloids and Colloid Drug Delivery Systems. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*; Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1990; 3, 31—63.
18. Bungenberg de Jong, H. G. *Reversible Systems. Colloid Science*; Kruyt, H. G., Ed.; Elsevier: New York, 1949; II, 335—432.
19. Green B. K.; Schleicher L. U. S. Patent, 2 800 458, 1957.
20. Khalil, S. A. H.; Nixon, J. R.; Carless, J. E. *J. Pharm. Pharmacol.* 1968, 20, 215—225.
21. Luzzi, L. A.; Gerraughty, R. J. *J. Pharm. Sci.* 1964, 53, 429—431.
22. Phares, R. E.; Sperandio, G. J. *J. Pharm. Sci.* 1964, 53, 515—518.
23. Zhou, S.; Hickey, A. J.; Jay, M.; Warren, S. M.; Lord, M.; DeLuca, P. P. *Pharm. Res.* 1988, 5, S76.
24. Nixon, J. R. *Microencapsulation*; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1976.
25. Gutcho, M. H. *Microcapsules and Other Capsules, Advanced Since 1975*; Noyes Data Corp.: Park Ridge, NJ, 1979.
26. Lim, F. *Biomedical Applications of Microencapsulation*; CRC Press Inc.: Boca Raton, FL, 1984.
27. Kondo, T. *Microencapsulation; New Techniques and Applications*; Techno Books: Tokyo, 1979.
28. Chang, T. M. S. *Artificial Liver and Artificial Cells*; Plenum Press: New York, 1978.
29. Chang, T. M. S. *Biomedical Applications of Microencapsulation*; Lim, F., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1984; 85.
30. Jarvis, A. P.; Spriggs, T. A.; Chigura, W. R. *In Vitro* 1982, 18, 276.
31. Donbrow, M. *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy*; Donbrow, M., Ed.; CRC Press: London, 1991; 1—14.
32. Kissel, T.; Demirdere, A. *Controlled Drug Delivery*; Müller, B. W., Ed.; Wissen-Schaftliche Verlagsge-Sellschaft mbH; Stuttgart, 1984; 103—131.
33. Gurney, R.; Peppas, N. A.; Harrington, D. D.; Banks, G. S. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1981, 7, 1—25.
34. Gupta, P. K.; Hickey, A. J. *J. Contr. Rel.* 1991, 17, 129—148.
35. Masinde, L. E.; Hickey, A. J. *Pharm. Res.* 1991, 8, S120.
36. Masinde, L. E.; Hickey, A. J. *Int. J. Pharm.* in press.
37. Gupta, P. K.; Hickey, A. J.; Mehta, R.; DeLuca, P. P. *Pharm. Res.* 1990, 7, S82.
38. Versic, R. J. *Drug Cosm. Ind.* 1989, 144 (6), 30, 32, 34, 75.
39. Maggi, G. C.; Di Roberto, F. M. *Microencapsulation*; Nixon, J. R., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1976; 103—111.
40. Lim, F.; Buchler, R. J. *Methods in Enzymology*; Langome, J. J., Van Vunakis, H., Eds.; Academic Press: New York, 1981; 73.
41. Lim, F. *Adv. Biotechnol. Progr.* 1988, 7, 185—197.
42. Walford, J.; Lim, T. M.; Lam, T. J. *Aquaculture* 1991, 92, 225—235.
43. Bodmeier, R.; Wang, J.; Bhagwatwar, H. J. *Microencaps.* 1992, 9, 99—107.
44. Benita, S.; Zonai, O.; Benoit, J.-P. *J. Pharm. Sci.* 1986, 75, 847—851.
45. Bodmeier, R.; Wang, J.; Bhagwaywar, H. J. *Microencaps.* 1992, 9, 89—98.
46. Hickey, A. J.; Fults, K.; Pillai, R. S. *J. Biopharm. Sci.* 1992, 3, 107—113.
47. Pillai, R. S.; Yeates, D. B.; Miller, I. F.; Hickey, A. J. *Proceed. Intern. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater.* 1992, 19, 224—225.
48. Conix, A. *Macromol. Synth.* 1966, 2, 95—98.
49. Leong, K. W.; Brott, B. C.; Langer, R. J. *Biomed. Mater. Res.* 1985, 19, 945—955.
50. Mathiowitz, E.; Langer, R. J. *Contr. Rel.* 1987, 5, 13—22.
51. Wurster D. E. US Patent 2 648 609, 1949.
52. Wurster, D. E. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 1959, 48, 451—454.
53. Robinson, N. J.; Gross, G. M.; Lantz, R. J. *J. Pharm. Sci.* 1968, 57, 1983—1988.
54. Porter, St. C. *Pharm. Technol.* 1979, 3, 54—59.

55. Porter, St. C. *Pharm. Technol.* 1980, 4, 66—75.
56. Lehmann, K.; Dreher, D. *Pharm. Ind.* 1972, 34, 894—903.
57. Banker, G. S. *Pharm. Technol.* 1981, 5, 54—62.
58. Lehmann, K. *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy*; Donbrow, M., Ed.; CRC Press: London, 1991; 73—97.
59. Burgess, D. J. *J. Coll. Interface Sci.* 1990, 140, 227—238.
60. Bungenberg de Jong, H. G.; Kruyt, H. R.; Lens, J. *Kolloidchem. Beih.* 1932, 36, 429—434.
61. Nixon, J. R.; Nouh, A. *J. Pharm. Pharmacol.* 1978, 30, 533—537.
62. Madan, P. L. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1978, 4 (95).
63. Burgess, D. J.; Carless, J. E. *J. Coll. Interface Sci.* 1984, 98, 1—8.
64. Calanchi, M. *Microencapsulation*; Nixon, J. R., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1976; 93—101.
65. Urmeda, T.; Matsuzawa, A.; Yokoyama, T.; Kuroda, K.; Kuroda, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1983, 31, 2793—2798.
66. Nakajima, T.; Takashima, Y.; Iida, K.; Mitsuta, H.; Koishi, M. *Chem. Pharm. Bull.* 1987, 35, 1201—1206.
67. de Sabata, V. *Microencapsulation*; Nixon, J. R., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1976; 143—162.
68. Jizomoto, H. *J. Pharm. Sci.* 1984, 73, 879—882.
69. Jizomoto, H. *J. Pharm. Sci.* 1985, 74, 469—472.
70. Burgess, D. J.; Singh, O. N. *J. Pharm. Pharmacol.* 1993, 45, 586—591.
71. Singh, O. N.; Burgess, D. J. *Pharm. Res.* 1972, 9 (S8).
72. Lim, F.; Sun, A. M. *Science* 1980, 210, 908—910.
73. Rha C. K.; Rodrigues-Sanches D. *US Patent.* 4 749 620, 1980.
74. Kwok, K. K.; Groves, M. J.; Burgess, D. J. *Pharm. Res.* 1991, 8, 341—344.
75. Bodmeier, R.; Chen, H. *J. Pharm. Pharmacol.* 1988, 40, 754—757.
76. Wan, L. S. C.; Heng, P. W. S.; Chia, C. G. H. *J. Microencaps.* 1992, 9, 53—62.
77. Hickey, A. J.; Tian, Y.; Parasrampur, D.; Kanke, M. *Biopharmaceut. Drug Dispos.* 1933, 14, 181—186.
78. DeLuca, P. P.; Hickey, A. J.; Hazrati, A. M.; Wedlund, P.; Rypacek, F.; Kanke, M. *Topics in Pharmaceutical Sciences*; Breimer, D. D., Speiser, P., Eds.; Elsevier: New York, 1987; 429—442.
79. Burgess, D. J.; Davis, S. S.; Tomlinson, E. *Int. J. Pharm.* 1987, 39, 129—136.
80. Burgess, D. J.; Davis, S. S. *Int. J. Pharm.* 1988, 46, 69—76.
81. Couvreur, P.; Kante, B.; Lenaerts, V.; Scailteur, V.; Roland, M.; Speiser, P. *J. Pharm. Sci.* 1980, 69, 199—202.
82. Couvreur, P.; Tulkens, P.; Roland, M.; Trouet, A.; Speiser, P. *FEBS Letters* 1977, 84, 323—326.
83. Couvreur, P.; Kante, B.; Roland, M.; Guiot, P.; Bauduin, P.; Speiser, P. *J. Pharm. Pharmacol.* 1979, 31 (331).
84. Seymour, R. B.; Carraher, C. E. *Polymer Chemistry*; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1988; 332—342.
85. Seymour, R. B. *Introduction to Polymer Chemistry*; McGraw-Hill: New York, 1971.
86. Harkins, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* 1947, 69, 1429—1444.
87. Harkins, W. D. *J. Polymer Sci.* 1950, 5, 217—251.
88. Smith, W. V.; Ewart, R. H. *J. Chem. Phys.* 1948, 16, 592—599.
89. Kotliar, A. M.; McDonnell, M. E.; Walsh, E. K. *A Guide to Materials Characterization and Chemical Analysis*; Sibilia, J. P., Ed.; VCH Publishers, Inc.: New York, 1988; 229—249.
90. Hanrahan, J. M.; Gabriel, M. K.; Williams, R. J.; McDonnell, M. E. *A Guide to Materials Characterization and Chemical Analysis*; Sibilia, J. P., Ed.; VCH Publishers, Inc.: New York, 1988; 81—84.
91. Seymour, R. B.; Carraher, C. E. *Polymer Chemistry, An Introduction*, 2nd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1988; 156—169.
92. Burgess, D. J.; Kwok, K. K.; Megremis, P. T. *J. Pharm. Pharmacol.* 1991, 43, 232—236.
93. Binns, J. S.; Mella, C. D.; Davies, M. C. *Proceed. Intern. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater.* 1990, 17, 150—151.
94. Davies, M. C.; Lynn, R. A. P.; Khan, M. A.; Paul, A.; Domb, A.; Langer, R. *Proceed. Intern. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater.* 1990, 17, 232—233.
95. Labhasetwar, V. D.; Doric, A. K. *J. Microencaps.* 1991, 8, 83—85.
96. Tabata, Y.; Ikada, Y. *Biomaterials* 1988, 9, 356—362.
97. Wake, W. C. *Adhesion and the Formulation of Adhesives*; Applied Science: New York, 1982.
98. Kinlock, A. J. *Adhesion and Adhesives: Science and Technology*; Chapman and Hall: London, 1987.
99. Benita, S.; Hoffman, A.; Donbrow, M. *J. Microencaps.* 1985, 2, 207—215.
100. Donbrow, M.; Hoffman, A.; Benita, S. *J. Microencaps.* 1990, 7, 1—9.
101. Rabisková, M.; Opawale, F. O.; Burgess, D. J. *Pharm. Res.* 1991, 9, S—149.
102. Yokel, R. A.; Sabo, J. P.; Simmons, G. H.; DeLuca,



- P. P. Toxicol. Letters 1981, 9, 165—170.
103. Schoen, F. J.; Kintanar, E. B.; Osol, R. G.; Lee, E. J. Biomed. Mater. Res. 1986, 20, 709—721.
 104. Vissher, G. E.; Robison, R. L.; Maulding, H. V.; Fong, J. W.; Pearson, J. E.; Argentieri, G. J. J. Biomed. Mater. Res. 1986, 20, 667—676.
 105. Willmott, N.; Cummings, J. Biochem. Pharmacol. 1987, 36, 521—526.
 106. Kanke, M.; Morlier, E.; Geissler, R.; Powell, D.; Kaplan, A.; DeLuca, P. P. J. Parent. Sci. Technol. 1986, 40, 114—18.
 107. Scheffel, U.; Rhodes, B. A.; Natarajan, T. K.; Wagner, H. N. J. Nud. Mod. 1972, 13, 498—503.
 108. Simon, S. I.; Schmid-Schonbein, G. W. Biophys. J. 1988, 3, 163—173.
 109. Rolland, A.; Begue, J. -M.; Le Verge, R.; Guillouzo, A. Int. J. Pharm. 1989, 53, 67—73.
 110. Makino, K.; Ohshima, H.; Kondo, T. J. Coil. Interf. Sci. 1987, 115, 65—72.
 111. Illum, L.; Hunneyball, I. M.; Davis, S. S. Int. J. Pharm. 1986, 29, 53—65.
 112. Illum, L.; Davis, S. S. J. Pharm. Sci. 1983, 72, 1086—1089.
 113. Jani, P.; Florence, A. T.; Halbert, G. W.; Langridge, J. J. Pharm. Pharmacol. 1989, 41, 47.
 114. Ritger, P. L.; Peppas, N. A. J. Contr. Rel. 1987, 5, 23—36.
 115. Pitt, C. G.; Schindler, A. Controlled Drug Delivery; Bruck, S. D., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1983; I, 53—80.
 116. Pitt, C. G.; Gu, Z. -W. J. Contr. Rel. 1987, 4, 282—292.
 117. Cheung, W. K.; Yakobi, A.; Silber, B. M. J. Contr. Rel. 1988, 6, 263—270.
 118. Carstensen, J. T. Controlled Drug Delivery; Müller, B. W., Ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; Stuttgart, 1984; 132—145.
 119. Crank, J. The Mechanics of Diffusion, 2nd Ed.; Oxford Science Publications; Oxford, 1975.
 120. Singh, S. K.; Fox, R. O.; Fan, L. T. Proceed. Intern. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater. 1987, 14, 65—66.
 121. Redmon, M. P. Physicochemical Characteristics of a Porous Polymer Matrix for Drug Delivery; Ph. D. Thesis University of Kentucky; Lexington, KY, 1989.
 122. Brannon-Peppas, L. Design and Mathematical Analysis of Controlled Release from Microsphere-Containing Polymeric Implants. J. Contr. Rel. 1992, 20, 201—207.
 123. Chang, T. M. S. Science 1964, 146, 525—525.
 124. Sefton, M. V.; Dawson, R. M.; Broughton, R. L.; Biysnink, J.; Sugamori, M. E. Biotechnol. Bioeng. 1987, 29, 1135—1143.
 125. Lamberti, F. V.; Sefton, M. V. Biochim. Biophys. Acta. 1983, 759, 81—91.
 126. Sun, A. M.; O'Shea, G. M.; Leung, Y. Artif. Organs 1983, 5 (Suppl.), 69.
 127. Sun, A. M.; O'Shea, G. M.; Goosen, M. F. A. Appl. Biochem. Biotechnol. 1984, 10, 87—100.
 128. Kwok, K. K.; Burgess, D. J. Pharm. Res. 1992, 9, 410—413.
 129. Floy, B. J.; Visor, G. C.; Sanders, L. M. Polymeric Delivery System; Properties and Applications. ACS Symposium Series; El-Nokali, M. A., Piatt, D. N., Sharpentier, B. A., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1993; 520, 154—167.
 130. Davis, S. S.; Illum, L.; McVie, J. G.; Tomlinson, E. Microspheres and Drug Therapy; Pharmaceutical and Medical Aspects; Elsevier: Amsterdam, 1984.
 131. Donbrow, M. Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy; CRC Press: London, 1991.
 132. Goosen, M. F. A. Fundamentals of Animal Cell Encapsulation and Immobilization; CRC Press: London, 1992.
 133. Guiot, P.; Couvreur, P. Polymeric Nanoparticles and Microspheres; CRC Press: Boca Raton, FL, 1986.
 134. Gutcho, M. H. Microcapsules and Other Capsules, Advanced Since 1975; Noyes Data Corp.: Park Ridge, NJ, 1979.
 135. Illum, L.; Davis, S. S. Polymers in Controlled Drug Delivery; Wright; Bristol, UK, 1987.
 136. Kondo, T. Microencapsulation; New Techniques and Applications; Techno Books; Tokyo, 1979.
 137. Lim, F. Biomedical Applications of Microencapsulation; CRC Press, Inc.; Boca Raton, FL, 1984.
 138. Müller, R. H. Colloidal Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting; CRC Press; London, 1979.
 139. Nixon, J. R. Microencapsulation; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1976.
 140. Tomlinson, E.; Davis, S. S. Site-Specific Drug Delivery; John Wiley & Sons; Chichester, UK, 1986.
 141. Kreuter, J. Colloidal Drug Delivery Systems; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1994.
 142. Benita, S. Microencapsulation; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1996.
 143. Diederichs, J. E.; Muller, R. E. Future Strategies for Drug Delivery with Particulate Systems; CRC Press; Boca Raton, 1998.
 144. Burgess, D. J. Colloids and Colloid Drug Delivery Systems. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; Marcel Dekker,

- Inc.; New York, 1990; 3, 31—63.
145. Davis, S. S. Colloids and Drug Delivery Systems. Pharm. Technol. 1987, 11, 110—117.
146. Kaye, B. H. Microencapsulation: The Creation of Synthetic Fine Particles with Specified Properties. Kona 1992, 10, 65—82.
147. Morimoto, Y.; Fujimoto, S. CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 1985, 2, 119—163.
148. Oppenheim, R. C. Solid Colloidal Drug Delivery Systems; Nanoparticles. Int. J. Pharm. 1981, 8, 217—234.
149. Thies, C. Microencapsulation. Encyclopedia of Polymer Science and Engineering; Kroschwitz, J., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1987; 9, 724—745.
150. Tomlinson, E. Theory and Practice of Site-Specific Drug Delivery. Adv. Drug Delivery Rev. 1987, 1, 87—198.
151. Torchilin, V. P. CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems 1985, 2, 119—163.
152. Yappel, A. F. Albumin Microspheres. Meth. Enzymol. 1985, 112, 3—67.

(柴瀚森 李 妍 译)





微生物鉴别用 DNA 探针

Wayne P. Olson

Consultant, Beecher, Illinois, U. S. A.

引言

在 1997 年和 1998 年一季度，在写原著第一版^[1]时谈到 DNA 探针，认为它主要是用于遗传的相关研究。在今天（2000 年中期），寡核苷酸（DNA，RNA 以及相关的）探针在各种姿态下在生物技术中已是一种成长产业，而且其应用遍及很大范围。1995 年，Theta 在（Gene Therapy/DNA Probes/PCR Markets）上的报告中预测在聚合酶链式反应（PCR）、DNA 探针和基因治疗的顺利应用等方面会有惊人发展，其对前两个的预测是正确的。在 1996 年，Frost 和 Sullivan 的市场报道指出，1995 年 DNA 探针市场销售额已超过 1.45 亿美元，并预测到 2003 年将达到 14 亿美元（美国 DNA 探针市场）。同样是在 1996 年，Business Communications Co., Inc. 在题为“DNA 试验和基因探针的进步和机会”中做了类似的预测。DNA 探针是体外诊断中增长最快的领域^[2]，每年的增长率为 25%^[2]。

早期和目前的版本中有关 DNA 探针的最重要的差别如下：

- 文章和应用数量猛增；在 Medline 上“DNA 探针”栏累积引用条目为 79 270 次。

- 特别是 PCR 的应用，现在几乎涵盖了生命科学的所有方面，包括农业、食品科学和非微生物病况，以及与人疾病相关的领域。

- 寡聚体芯片（以 DNA 或 RNA 为基础的阵列，在某些情况下也称其为微芯片）的应用已在制药/生物技术研发中迅速成长起来。这种方法即使还不突出，在很多应用方面也是适合的。

- 由于在 2000 年中期公布的临床一期患者死亡而失宠的反义治疗也正在反弹。反义的一些形式显示作为抗微生物有很高的潜在性。

在微生物学和相关争论点上，将“DNA 探针”当前的说法与初版中省略的某些背景材料中的文章一起作为关注点。不熟悉 DNA 探针原理的读者请查阅原著第一版 Vol. 19 参见文献 [1]，特别是该文章中绪论的表 1 在这里也作为表 1 列出，但没有提供参考资料。作者也推荐基因组学新手读一篇或更多的基本参考文献^[3~5]，其中 Keller 和 Marak 的文章是关系最为密切的。在原著第一版中没有引用的基础教材列在表 1 中。这些文献的编辑是科学著作的重要贡献者，据我所知有 Clapp、Higgins、Kricka、Marak 和 Persing。推测其他人也做了基础研究，但是我还没有读过他们的文章。

表 1 关于寡核苷酸探针的全部或部分文章

年份	作者	标题	出版商
1996	Persing, D. H.; Clapp, J. P.	PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases Species Diagnostic Protocols; PCR and Other Nucleic Acid Methods, Vol. 60	ASM Press Humana
1995	Hames, B. D.; Higgins, S. J.	Gene Probes; A Practical Approach, Vols. 1 & 2	Oxford University Press
1994	Svendsen, P.; Hau, J.	Handbook of Lab Animal Science, Vols. 1 & 2	CRC Press
1993	Keller, G. H.; Manack, M. M.	DNA Probes	Stockton Press
1993	Persing, D. H.; White, T. J.; Tenover, F. C.; Smith, T. F.	Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications	ASM Press
1991	Stanley, P. E.; Kricka, L. E.	Bioluminescence and Chemiluminescence; Current Status	Wiley
1990	Boulton, A. A.; Baker, G. B.; Campagnoni, A. T.	Molecular Neurobiological Techniques	Humana

像寡聚体探针这样科学上快速增长的领域在互联网上是被引用得最快的。正常的印刷出版物可能在工作完成后 1~3 年才出现。许多互联网发表的文章参照印刷出版物类似的方式。在这里的许多参考文献是从互联网上得来的。

尽管在这里引用了小部分专利、规章和市场资料，读

者还是应该注意以下几个方面：

- 许多有成就的科学家宁可选择提交专利特许证也不愿意用传统的方式发表。
- 在很长时间里消极的报告在科学文献里看不到。
- 对一项新的商业冒险，一流的技术常常是不够的；

好的商务管理和充足的财力同样是重要的。因此,许多不重要的工作不见了。

对消失的公司和产品的跟踪是困难的,除非它们被其他公司收购(表2)。例如,生物技术研究(BRL)及其研究的多肽核酸寡聚体(PNA)被波士顿生物医药公司(BBI)收购。跟踪 BRL 及其给 BBI 的特有的目标物 PNA,通过网页连接就简单化了,这对具有中等水平计算机应用知识的读者是容易的。

定义

单个寡聚核苷酸或整个基因的扩增:见聚合酶链式反应。

cDNA:通过 PCR 或 RT-PCR 由来的 DNA 的拷贝。

DNA 探针:在生物体中的或从生物体中得到的特定序列(通常是一种基因)互补的一段寡聚核苷酸序列。在这里 DNA 是指探针的种类。

dsDNA:双链 DNA,如在双螺旋中。

内切酶:一种只在寡聚核苷酸链特定的碱基间水解(打断)的酶;因此,一种特定生物体的 DNA 通过内切酶作用产生的 DNA(寡聚体)片段的样式是可以复制的。

基因组:一种生物体的整个 DNA 补体基因体;在病毒中的基因组含遗传信息。

吗啉寡聚体:一种惯例主链上含吗啉代类似物的寡聚体[图1(a)]。

核苷:戊糖和嘌呤或嘧啶碱基组成的分子。

核苷酸:磷酸化的核苷。

寡聚核苷酸(也称为寡聚体):通常是一段有磷酸酯主链的 DNA 或 RNA 链的序列,但可能在一个磷酸酯位置上有一个硫酸、多肽或吗啉代主链以减少或消除内切酶对寡聚核苷酸的降解。

PCR:见聚合酶链式反应。

磷酸硫化寡聚核苷酸:在磷的位置上带有硫的寡聚核苷酸(通常的探针)[图1(c)]。

PNA 寡聚体:多肽核苷酸寡聚体[图1(d)];制造商有波士顿探针(Boston Probes)公司(www.bostonprobes.com)、丹麦公司、Panthecho(www.panthecho.com)和遗传学研究所(Research Genetics)(www.resgen.com)。这些寡聚体跟吗啉代类似物一样,耐核酸酶消化。

聚合酶链式反应:在体外相当快速地以数以百计的形式产生 DNA 或 RNA 特定片段拷贝的方法(扩增)。被复制部分的末端的序列必须清楚,以便引物能被退火到要被复制的变性寡聚物上。要查阅 PCR 应用的有关资料可以从 www.eppendorfsi.com/application.html 上找。

引物:加在要被复制的 DNA 或 RNA 末端的合成寡聚体片段。变性的寡聚体靶与引物一起被退火,然后互补核苷酸在 DNA 聚合酶作用下直到全部拷贝产生。图表及进一步的说明见参考文献[1]。

逆转录酶(RT):从 RNA 病毒中来的以 RNA 编码

cDNA 的酶。

正链:在双链 DNA 中,导致编码蛋白质的那条链。另外一条链是互补的,并且它保护正链。

ssDNA:单链 DNA,与双链 DNA 相反。

寡聚核苷酸探针的靶:通常是核糖体 RNA(rRNA),该探针核苷酸中的尿嘧啶用胸腺嘧啶代替,它是与双螺旋中的 dsDNA 的正链互补的。

三联体密码:虽然编码蛋白质的氨基酸序列是由 DNA 中的三个核苷酸组合而定,实际上蛋白质合成的蓝图是从 DNA 被转录在 RNA 中的。例如,从一个基因复制而来的 RNA 中,UAU(尿嘧啶-腺嘌呤-尿嘧啶)或 UAC(第二个尿嘧啶位置上是胞嘧啶)是酪氨酸的三联体密码子。

表2 生产和(或)销售寡核苷酸探针和序列的公司
(按字母顺序列出部分)

Probes	Affymetrix
Bayer	Aventis
Chiron	BioMerieux
Digene	Nanogen
Gen-Probe	Oncogene Science Diagnostics
Roche	Roche Molecular Systems
Oligos-on-a-chip	

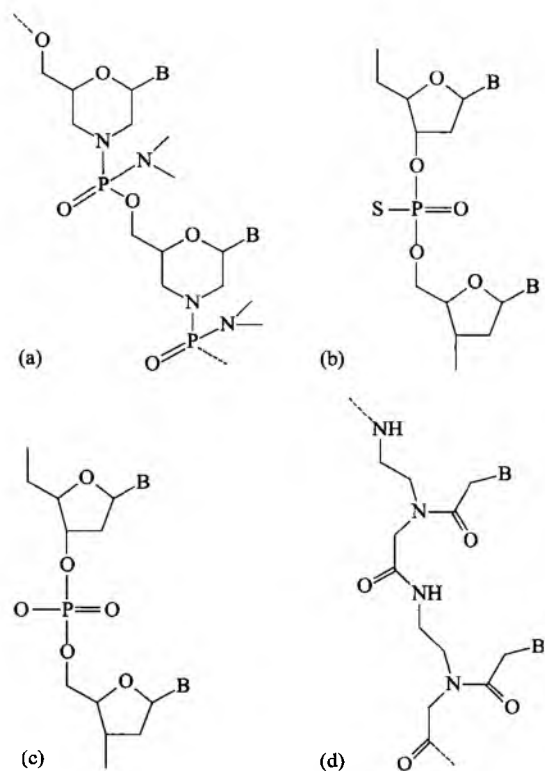


图1 辅酶 I 结构(找到的各种辅酶 I)。(a) 吗啉代类似物; (b) 正常的 DNA 或 RNA; (c) DNA 的磷酸硫化类似物; (d) 多肽核苷酸

W

简要背景

生物体（单细胞或多细胞的）的每项性质都由其基因组所决定。例如，所有的代谢过程都是由基因组中编码的酶所决定 [在质粒中有些酶从微生物细胞输入和（或）输出，质粒是从微生物染色体分离出来的基因的封闭 DNA 环]。在一些病毒中，基因组是单链 DNA 或 RNA，但在大多数生物中包括微生物在内，它是双链 DNA。双链 DNA 的双螺旋含一条有义链，它所携带的核苷酸三个一组编码子的序列决定它们所编码的蛋白质氨基酸序列。双链 DNA 的另外一条核苷酸链是互补有义链的，并且它能使有义链稳定（图 2）。

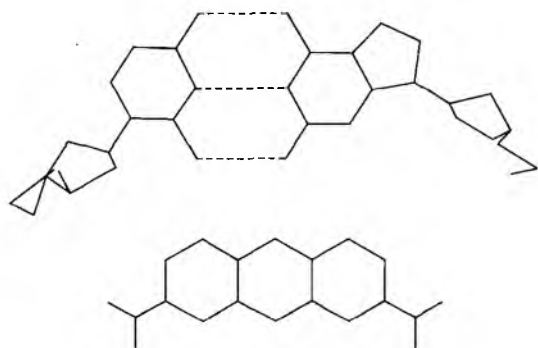


图 2 在 dsDNA（上方）和吡啶橙（下方）中碱基对的图示。在连续的碱基对中心吡啶橙嵌入，延伸到磷酸骨架

虽然微生物细胞中某些 DNA 片段能提供信息，它能鉴别这个细胞的种属，但是每个细胞仅有 DNA 的单拷贝。每个细胞可以有 10^4 或更多的 16SrRNA，参与不同蛋白质（通常是酶）的生产供细胞所用。相对分子质量 16S（标示为超离心时的斯韦德贝里单位）的 rRNA 提供了适于鉴别微生物种属的区域（图 3）。

如果一种生物体的 16SrRNA 能被制成寡聚体探针，通常用一些方法打开这个生物，那么就有可能去查看微生物与已知序列的标记合成寡聚体探针退火（形成双合体）后的 rRNA 是否相同。这有几种做法。但是，从我的观点来看，除非对生物体的种属有相当多的了解，否则这种方法在标记探针应用上是相当费钱的。

寡聚体探针恰当的用途

从我的观点来看，在标记探针用于未知生物体鉴别之前，这种生物体应该进行试验性鉴别。Bergey 手册中得出来的传统方法虽然有效但是很慢。如果患者不属于极端的例子，脂肪酸甲酯法（FAME）^[6]或在文献 [7] 中所述的方法通常是很精确也是相当快的。也要记住传统的候选方法（如 Bergey 手册）是一步步呈树枝状展开进行的，对缺乏经验的微生物学者而言，在连续步骤中任何一步出现差

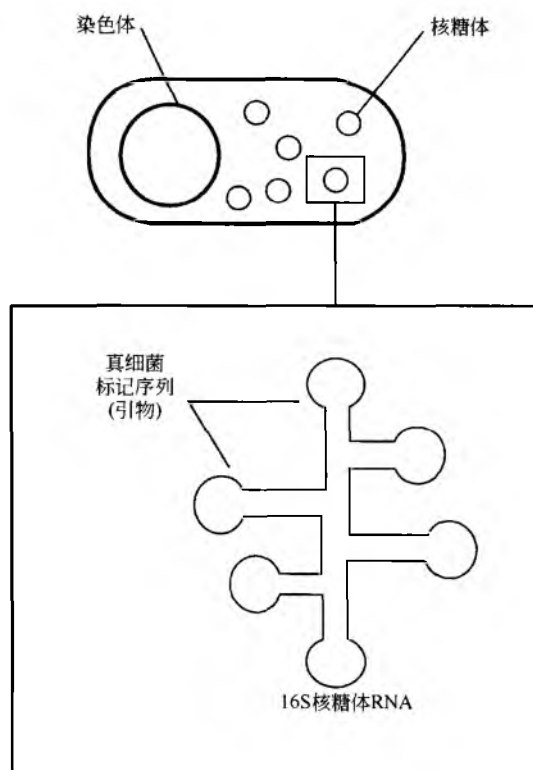


图 3 包含 16SrRNA 的细菌或真菌中染色体外的核糖体

错都可能造成鉴别的差错。在鉴别过程中的差错越早出现，鉴别中出现的错误就越大。

如果初试信息是可利用的（如病原性指示物），那么付出最有效和最可靠的方法可能是直接用探针。还有，探针最有意义的是广泛筛选肺结核这样的具体疾病。无论是人、动物或是植物在疾病状态下，其症状可能会指出存在一种或一些病原菌。在这些情况下，直接应用探针是明智的和经济的。不是基于基因组的而是基于化学分析仪器鉴定变得越来越有效，但常常是不必要。

取决于生物体中寡聚体靶的探针是以实用和效果为目的的。随（如气相色谱的 FAME 图谱或质谱/模糊逻辑谱等）非基因组的仪器来的错误是由于被寻找的生物体不在仪器的数据库中，或者由于生物体的细胞量不够或抽提不完全，因此寡核苷酸、低聚糖和脂肪酸甲酯等关键化学品的浓度太低。

对一些生长非常慢的，如 *Mycobacterium tuberculosis* 和 *M. leprae* 生物体，用探针针对样品液或组织进行分析时生物体可能是足够的，用 DMSO 作为渗透助剂使化学发光标记的寡聚体探针与生物体的基因组接触。然后生物体的 DNA 此时在紫外光照射下发出荧光。www.jic.bbsrc.ac.uk/staff/pat-heslop-harrison/methods/probe.html 对个别指导探针标记是有用的。这种荧光标记探针的方法用于测定人或动物组织中与癌症或遗传效应有关的基因，这种方法被称为荧光原位杂交（FISH）。



用磁性珠界定寡聚体

杂交及其相关的方法已在以前的综述^[1]中讨论过了。一种很快的方法是运用将特定的寡聚体固定在 Dynal[®] 磁性珠上。这种方法的特点是珠子与特定的寡聚体序列（或抗原、抗体及其他结合体）共价偶联在装有溶液或悬浊液的非金属容器（如试管）中，甚至在目标物（生物体，尤其是病毒）浓度很稀的情况下也能反应。然后在容器的一侧放一块磁铁简单地将珠子集中起来。最后将含反应目标物很少的珠子留在原始溶液中移去，并在原位洗涤珠子。寡聚体磁性珠的方法在文献 [7] 中已有概述。用 PolydT 珠子^[8]回收末端 PolyA 序列的 mRNA。

基础的磁性珠专利好像是属于 Dynal 公司所有，但是 Clemente 联合公司（原为 Quantum Magnetics 公司，Madison, CT）生产了 3~5 μm 直径的带镍磁性微粒用于细胞、蛋白质或二者同时进行“磁性层析”。Qiagen 公司（Valencia, CA, 和其他地点）上市了组氨酸标记的含镍琼脂糖磁性珠。Bangs Laboratories (Fishers, IN) 也生产 2 μm 直径的带有表面羧基基团的珠子用于结合配体的偶合。Seradyn 公司 (Indianapolis, IN) 用珠子分离 DNA。所有这些产品都能携带寡聚体探针。CPG 公司 (Lincoln Park,

NJ) 生产了一种结合生物素基化分子抗生蛋白链菌素磁性多孔玻璃，用于各种细胞、非细胞内颗粒和包括 DNA 与 RNA 大分子的各种寡聚体探针纯化。

种种基质的非磁性珠都可以通过各种化学法与寡聚体、抗体、抗原或其他偶合，这种非磁性珠由 Polymer Laboratories (www.polymerlabs.com) 提供可用于柱子及悬浮液。

聚合酶链反应 (PCR) 和微生物检测

在每毫升或每克体液或市售牛肉组织中存在病原性 DNA 病毒 10 个左右的拷贝，为了分析试验将可疑材料接种到细胞培养或动物试验是需要很长时间且很费钱的方法。像其他许多试验一样，这种方法在食品工业或医院中应用是不现实的。如果我们寻找像狂犬病这样特别的病毒，那么最快速、实用和有效的检测病毒颗粒的方法是 PCR。

实施 PCR 的一般顺序示于图 4 中。应用的引物是对检测的生物体有特异性的寡聚体。着手从一个或几个生物体中回收 DNA，基因组材料在 35~90min 内可扩达 $10^7 \sim 10^8$ 倍。与之相比，在细胞培养中病毒颗粒生长达到同样数目（可以进行单克隆抗体分析）通常需要 48h 或更多的时间。在一种精密分析天平上进行生物悬滴培养时，时间可以达到临界点。

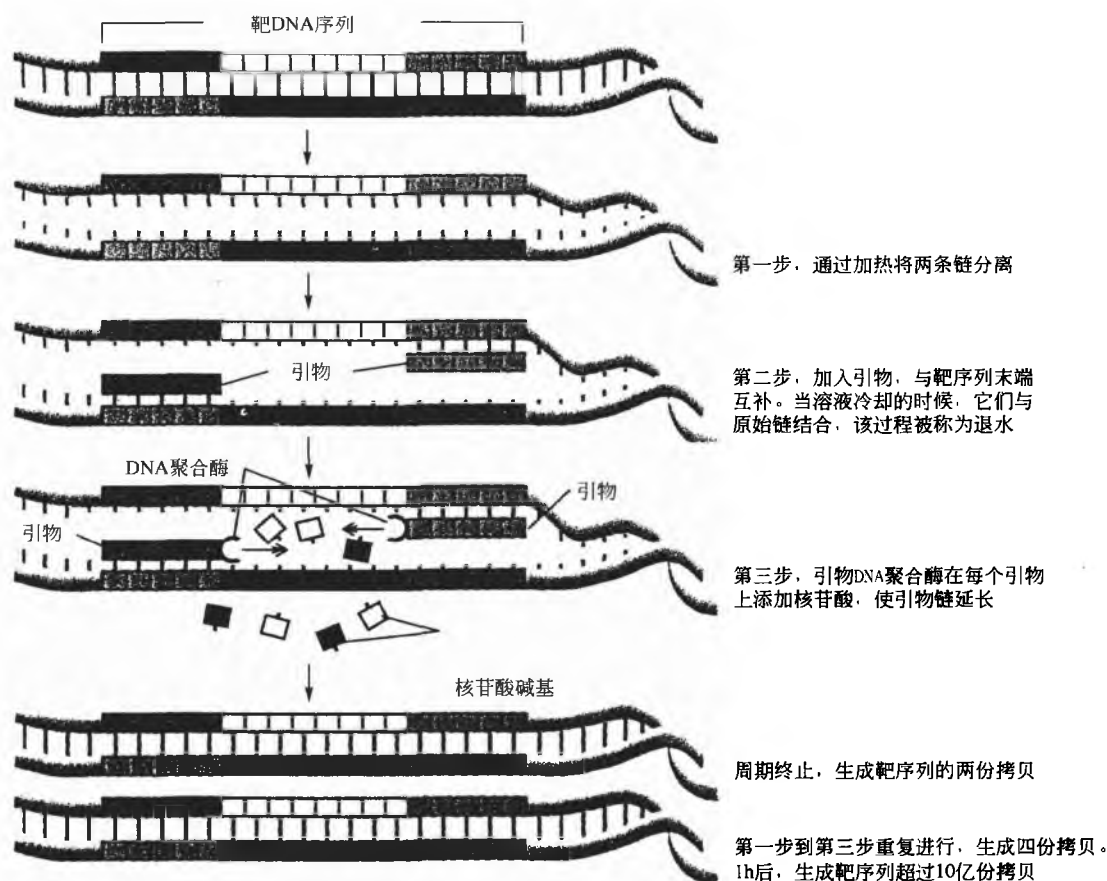


图 4 PCR 的进程

同样,对细菌或真菌病原菌,用 PCR 扩增供分析所需足够的基因组材料需要 35~45min,但在合适的营养培养基中,传统培养需要 24~48h。一些 PCR 有用的背景信息由 Eppendorf 的网页 (www.eppendorphi.com/application.html) 提供。读者也可参考以前的版本,它提供的细节,情况稍有一些不同。引物 (PCR 所需的 DNA 探针) 已由 Steve Rozen (Whitehall Institute, MIT 基因组研究中心,剑桥,MA) 特别介绍过。他开发的材料可以通过 www.genome.wi.mit 免费得到,好像很难重新获得。有关 HIV 的引物在 www.appliedbiosystems.com/pc/catalog/pg25.html,网上能够看到。

逆转录酶 PCR (RT-PCR) 将正常的 RNA 逆向转录到 DNA 序列。逆转录酶是一种在 RNA 病毒中发现的酶,当它被加到 RNA、脱氧核苷酸、逆转录酶等溶液中可产生与从一种生物体中回收到的 RNA 等当量的 DNA。回收足够量的 cDNA (从 RNA 中产生的 DNA) 能用一种很有特征的内切酶进行“修剪”,产生的 cDNA “指纹”与已知指纹 RNA 的来源进行比较。这种实验的自动化系统可从杜邦的子公司 Qualicon (info@qualicon.com) 或从 Applied Biosystems 公司 (www.appliedbiosystem.com/lab/about/mm/microseq/microseq500/) 购得。

在分析阵列中的固定化寡聚体或基因

正如原著第一版^[1]相应章中所介绍的那样,在微量滴定板的孔或载玻片这样分析用阵列中采用固定化寡聚体除用于候选药物 (游离) 与人或动物基因序列 (固定化) 的相互作用的药物筛选之外还被用于检测癌症及其先兆期 (突变)。一个微阵列技术的个别指导由 North Carolina State University 的 Virginia Tech and the Forest Biotechnolo-

gy Group 呈献^[9]。

为了给读者提供对于阵列适用性的正确评价,作者认为组合化学^[10]具有这种可能性。一种可能的方法包括抽提几百种纯性培养细菌种各自的基因。在聚乙烯丙烯酸铸造的微滴定板的每一个孔中加入单个细菌种的基因片段,这种片段是从一个特定菌落细胞的 DNA 用一种已知内切酶“修剪”制得的,并且通过 3'-OH 固定在板的底部。一个好的固定化系统是为偶合线形微生物 DNA 链的三嗪法 (图 5)。每个板约有 100 个孔和 100 种人致病微生物的基因组,分别加入试图作为潜在药物试验用的许多种合成寡聚核苷酸中的一种,药物是有限的混合物,每一种都未经纯化,但可复制,每一种均有低毒性标记,宁可有化学荧光但不要有同位素。

让肽核酸 (PNA) 类药物和固定的微生物基因组有些反应时间并被冲洗,然后用各种病原菌基因组片段测试 (自动或用肉眼) 合成候选药物的持续力。通过这种方法,可能筛选到与已知生物体的固定化基因组特异结合的候选寡聚体,即使病原菌的基因序列是未知的,以及所给病原菌基因组相结合的准确序列还不太精确也没有关系。

这种组合类型的方法对新产物的开发似乎很有前途,它能全部或部分自动化。这样的系统已广泛地用于制药工业的各种应用。所给的例子是大家熟知的由组合化学方法变化而来的。

这种变化的方法已经由美国国立环境健康科学研究所提出用以评价作为潜在人毒素的化学品的。固定在微量滴定板上的人基因与已知的和未知的毒物接触的目的在于来寻找基因结合模式的相似点^[11]。Origene (Rockville, MD)、Qiagen (Valencia, CA 以及其他地方)、CCS Packard (Meriden, CT) 以及其他许多公司可以加到阵列类型制造商/供货商的名单里,列在参考文献 [1] 的表 3 中。

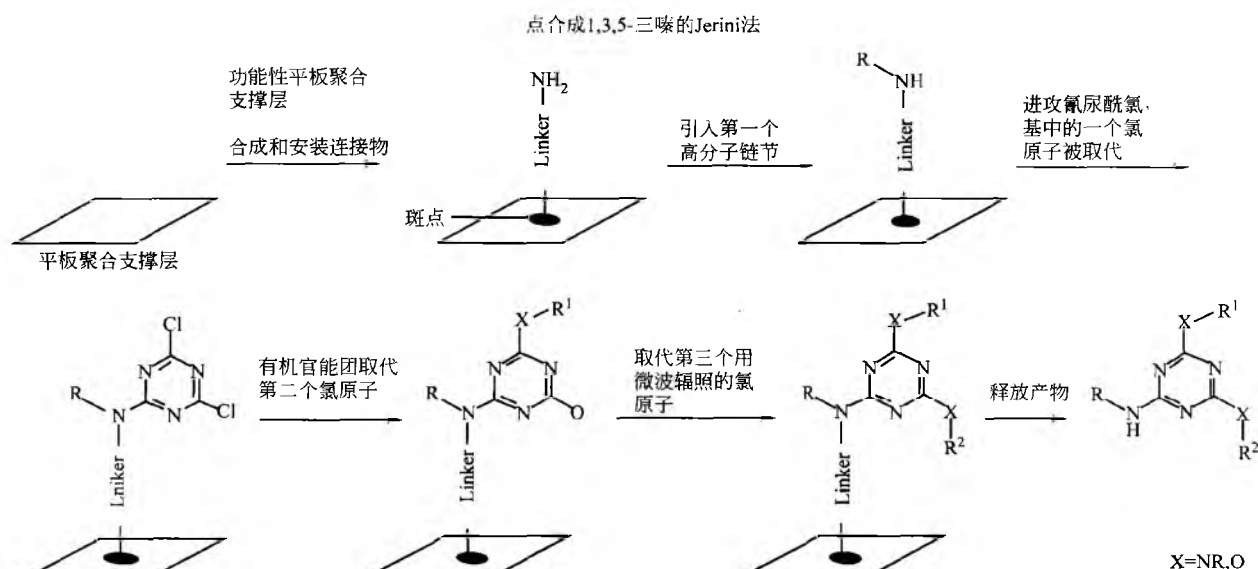


图 5 通过三嗪将微生物的 ssDNA 或 RNA 或类似物偶联到微量滴定板的孔中



抗微生物特定的寡聚体探针

如果细胞要繁殖，细胞的 DNA 必须被复制。细胞代谢并起作用需要某些酶（与休眠状态相反），因此通常在细胞中会产生这些酶。如果一种反义探针与细胞中临界 RNA 反应就可以有效地使细胞暂停活动。这可以从体外和体内观察到。但是寡核苷酸通过核酸降解根据其特异性，在某些碱基序列修剪核苷酸，常常使寡聚体降低功能或失去功能（这也是 DNA 在生成“指纹”过程中怎样被修剪的）。

如果一种专一品种的反义寡聚体探针能被制成可耐酶降解的，如果它能容易地进入微生物，那么这种探针不只是鉴别生物体，也可以牢牢地把细胞的代谢潜在性关闭^[11]。反义 PNA 寡聚体好像符合这些要求，并感觉其解离常数（ K_d ）比磷酸盐骨架反义要低^[12]。PNA 反义探针具有专一应用的潜能，在体内作为低毒性杀微生物剂^[13]。DNA 探针的多肽类似物由专利保护^[14]。

波士顿生物探针公司正为寡聚体研究、诊断学开发、食品测试和环境研究等生产 PNA 类探针。Perkin-Elmer（现重新命名为 Analytical Biosystems, Foster City, CA）已经由 BBI 投资参与 PNA 技术。

治疗用反义探针

反义探针研究的最初目标是所有癌细胞的增殖。

癌性细胞是不具有功能的，如在肺中不进行气体输送。像病毒一样，它们拟人化存在的理由仅仅是再生长，而不是对该类生物体履行一项服务。另外，通常的细胞生命是有限的，因此必须不时地更替。

用在传统的化学治疗和放射疗法的毒物不仅杀死相当比例的能很快再生的细胞，而且也破坏骨髓和循环血浆中的干细胞，干细胞产生生活不可缺少的用于保护红细胞、白细胞和血小板的细胞。为此，从患者自身来源的有希望没有癌的干细胞（CD34+）是患者进行大剂量放射疗法或化学治疗（或二者）之前回收到的。接受大剂量化学治疗或放射疗法（或二者）的患者在治疗之前取出健康的干细胞，然后经静脉注射后到达髓中替换因化疗或放疗而被破坏的基本细胞。

此外，虽然化学治疗和放射疗法对患者能起“治疗作用”，但一旦健康的细胞没被杀死，也有可能发生基因组的关键部分发生突变。经常见到接受了“大剂量”治疗的患者在最初治疗的 20 年后长出新的肿瘤病灶。最终挽救过患者

的，非选择性的毒物最后却杀了他。“这种治疗是成功的，但是患者却死了”。

理论上，反义技术的好处就是寡聚体探针不会随意损害任何类型的细胞，也不会诱导突变。反义使某些细胞停止工作，而另一些细胞没有。反义治疗与基因治疗不同，反义治疗是将一种缺失的或失灵的基因，如在绝大多数的血友病患者中的人凝血因子Ⅷ基因，放置到自身细胞中并返回给患者。

Eric Wickstrom 教授（Kimmel 癌症中心，Thomas Jefferson 大学，费城，PA）已经很好地研究了小鼠模型对反义、Burkitt 淋巴细胞、狂犬病毒和人 cMYC 癌基因的作用，这些只是其中的一部分工作。该研究组在研究磷硫酰类反义、肽核酸类反义和其他变化。他的网页为 www.kcc.tju.edu/staff/wickstrom，他最近的几篇文章^[15,16]和书^[17]对反义感兴趣的读者是很有趣的。他在合成方面^[18]和将反义导入细胞^[19]中的专利是适当的。

Wickstrom 的一些工作是针对反义进入细胞中的争论。至少一个公司 Gene Therapy Systems 已经致力于此项研究（www.genetherapysystem.com）。

探寻完整 DNA 的小的、非特异性有机探针

一些有机分子对 DNA 有很高的亲和性（低 K_d ）且是按化学当量的，但按互补寡核苷酸的方式是没有特异性的。例如，吖啶橙 [AO, 图 6(a)] 是平面分子，并且是在 ds-DNA 的氢键含碱基对（A-T, G-C）之间插入的（图 2）。当 AO 穿透进细胞并与双链 DNA 反应时，用蓝光激活细胞发出绿光。AO 通过堆积在骨架的带电磷酸盐上也与单链 DNA 或 RNA 反应；单链 DNA 发红色荧光。

像 Hoechst 33342 [图 6(b)] 这样的苯甲酰胺结合到在双链 DNA 的小槽中富含 A-T 的区域。当足够的染料用蓝光激发时，发射的是红光。抗生素普卡霉素和色霉素 A3 [图 6(c) 和图 6(d)] 结合到双链 DNA 的 G-C 区域。

DNA（双链和单链）和 RNA 的这些分子探针不能鉴别生物体，但是可以指出可能发生的可行性，因为基因组未受损伤。当细胞在悬浮液中或玻璃片上时被染色并在紫外光照射显微镜或流式细胞仪下检查其活性能有个评论，细胞可以分造或不分造精确性和准确性相当高。这些研究以及相关的热门话题可参考文献^[7]以及分子探针网页（www.probe.com）中的一部分，读者会发现特别有用。

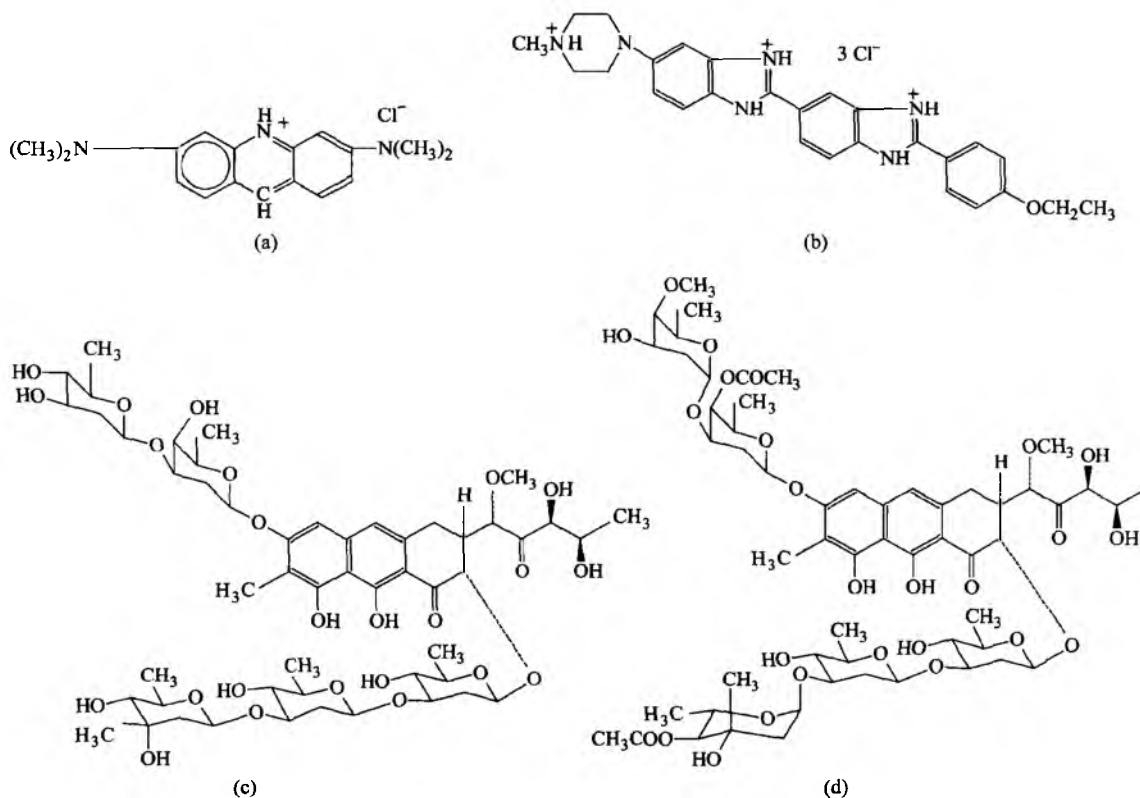


图6 有机小分子与 DNA 和 (或) RNA 相互作用, 用一种波长光激发, 在另一波长下产生荧光。

(a) 吡啶橙; (b) Hoechst 33342; (c) 普卡霉素; (d) 色霉素 A3

参考文献

- Olson, W. P. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; 2000; 19, 103—120.
- Nelson, N. C. Molecular tools for building nucleic acid IVDs; 1998; www.devicelink.com/ivdt/archive/98/03/013.html.
- Keller, G. F.; Manak, M. M. DNA Probes: Background, Applications and Procedures, 2nd Ed.; Macmillan Reference, Ltd.: 1993.
- Singer, M.; Berg, P. Genes & Genomes. University Science Books; Mill Valley, CA, 1991.
- Davies, J.; Reznikoff, W. S., Eds.; Milestones in Biotechnology; Butterworth-Heinemann; Boston, MA, 1992.
- Gilbert, G. L.; James, G. S.; Sintchenko, V. Med. J. Aust. 1999, 171 (10), 536—539.
- Calomiris, J. J. Monitoring Waterborne Pathogens Using DNA Probes; 6th CBW Protection Symposium; Stockholm, May 1998; 10—15.
- Miltenyi Biotech. 1999; www.miltenyibiotec.com.
- Alscher, R. Microarray Technology, www.bsi.vt.edu/ralscher/gridit/intro_ma.htm.
- Olson, W. P. Genet. Engineer. News 1997, 17 (7), 1—36.
- NIEHS Environmental Health Institute to use Gene Chips to Evaluate Chemicals for Potential Harm to Humans, 2000, www.niehs.nih.gov/oc/news/toxchip.htm.
- PNA-The Ultimate Antibiotic, Pantheco A/S. Hørsholm, Denmark. www.pantheco.com/pna.html (1999).
- Nielsen, P. E.; Buchardt, O.; Egholm, M.; Berg, R. H. Peptide Nucleic Acids. U.S. Patent 5 539 082, July 23, 1996.
- Nielsen, P. E.; Egholm, M. Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications. Horizon Scientific Press; 1999.
- Wickstrom, E.; Smith, J. B. Cancer J. 4, S43—S47.
- Smith, J. B.; Wickstrom, E. J. Nat. Cancer Inst. 1998, 90, 1146—1154.
- Wickstrom, E., Ed.; Clinical Trials of Genetic Therapy with Antisense DNA and DNA Vectors; Marcel Dekker, Inc.: 1998.
- Wickstrom, E.; LeBec, C. Stereospecific Solid Phase Synthesis of Oligodeoxynucleoside Alkyl Phosphonates by Pentavalent Grignard Coupling, US Patent 5 703 223, 1997.
- Wickstrom, E.; Cleaver, S. H. Composition and Method for Targeted Integration into Cells. US Patent 5 958 775, 1999.

进一步阅读

- Anonymous, Ed.; Development of DNA Probes for *Babesia ovata* Detection and Identification, 1995. <http://ss.niah.affrc.go.jp/topics/1995/95013.html>.
- Anonymous. DNA Probes with PCR Assay for the Detection and Identification of *Haemophilus ducreyi*. www.hri-net.org/techtran/technologies/ducreyi.html.
- Burstein, G.; Snyder, M.; Conley, D.; Howell, M.; Bockeloo, B.; Quinn, T.; Zenilman, J. J. *Pediat. Adolesc. Gynecol.* 2000, 13 (2), 91.
- Clapp, J. P.; Fitter, A. H.; Young, J. P. *Mol. Ecol.* 1999, 8 (6), 915—921.
- Clement, P.; Springael, D.; Gonzalez, B. *Can. J. Microbiol.* 2000, 46 (5), 485—489.
- Coustou, V.; Deleu, C.; Saupe, S. J.; Begueret, J. *Genetics* 1999, 153 (4), 1629—1640.
- Danish, E. P. A., Ed.; *Vibrio vulnificus* in Denmark, www.mst.dk/200002pubs/87-7909-344-2/helepubl_eng.htm.
- Elnifro, E. M.; Cooper, R. J.; Klapper, P. E.; Yeo, A. C.; Tullo, A. B. *Investigat. Ophthalmol. Visual Sci.* 2000, 41 (7), 1818—1822.
- Hardin, B., Ed.; DNA Probes Foil Spoilage Yeasts, 1999, www.ars.usda.gov/is/AR/archive/aug99/dna0899.htm.
- Hilali, F.; Ruimy, R.; Saulnier, P.; Barnabe, C.; Lebouguene, C.; Tibayrenc, M.; Andreumont, A. *Infect. Immun.* 2000, 68 (7), 3983—3989.
- Jardi, R.; Buti, M.; Rodriguez-Frias, F.; Cotrina, M.; Costa, X.; Pascual, C.; Esteban, R.; Guardia, J. J. *J. Virol. Meth.* 1999, 83 (1/2), 181—187.
- Löffler, F. E.; Sun, Q.; Li, J.; Tiedje, J. M. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66 (4), 1369—1374.
- McFadden, J.; Collins, J.; Beaman, B.; Arthur, M.; Gitnick, G. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30 (12), 3070—3073.
- Mesarch, M. B.; Nakastu, C. H.; Nies, L. *Applied and Environ. Microbiol.* 2000, 66 (2), 678—683.
- Michotey, V.; Mejean, V.; Bonin, P. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66 (4), 1564—1571.
- Monpochoe, S.; Dehee, A.; Mignotte, B.; Schwartzbrod, L.; Marechal, V.; Nicolas, J.-C.; Billadudel, S.; Ferre, V. *BioTechniques* 2000, 29 (1), 88—93.
- Monstein, H. J.; Johansson, Y.; Jonasson, J. *APMIS* 2000, 108 (1), 67—73.
- O'Connor, L.; Joy, J.; Kane, M.; Smith, T.; Mather, M. *J. Food Prot.* 2000, 63 (3), 337—342.
- Ogunseit, O. A.; Sayler, G. S.; Miller, R. V. *Applied & Environ. Microbiol.* 1992, 58 (6), 2046—2052.
- Olson, W. P. *Rapid Analytical Microbiology*. Olson, W. P., Ed.; Serentec Press: Raleigh, NC, 2001.
- Patel, R.; Newell, J. O.; Procop, G. W.; Persing, D. H. *Am. J. Clin. Pathol.* 1999, 112 (1), 36—40.
- Prescott, A. M.; Fricker, C. R. *Lett. Appl. Microbiol.* 1999, 29 (6), 396—400.
- Roring, S.; Hughes, M. S.; Skuce, R. A.; Neil, S. D. *Vet. Microbiol.* 2000, 74 (3), 227—236.
- Rosenberger, C. M.; Scott, M. G.; Gold, M. R.; Hancock, R. E.; Finlay, B. B. *J. Immunol.* 2000, 164 (11), 5894—5904.
- Sakai, T.; Ikegami, K.; Yoshinaga, E.; Uesugi-Hayakawa, R.; Wakizaka, A. *Tohoku J. Exp. Med.* 2000, 190 (2), 119—128.
- Selim, A. G.; El-Ayat, G.; Wells, C. A. *J. Pathol.* 2000, 191 (2), 138—142.
- Smith, A. H.; Siegel, J. P. In *Automated Microbial Identification and Quantitation*. Olson, W. P., Ed.; Interpharm Press: 1996.
- Species Complex of Grasshopper Pathogens. USDA Agricultural Research Service: 'TEKTRAN', www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/000006/45/0000064540.html.
- Tamura, M.; Watanabe, K.; Imai, T.; Mikami, Y.; Nishimura, K. *Clin. Lab.* 2000, 46 (1/2), 33—40.
- Walsh, S. R.; Bidochka, M. J.; Roberts, D. W.; Humber, R. A.; Tyrrell, D.; Silver, J. C. Characterization of DNA Probes Specific for Different Pathotypes of the *Entomophaga grylli* Species Complex of Grasshopper Pathogens. USDA Agricultural Research Service: 'TEKTRAN', www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/000006/45/0000064540.html.
- Wang, H.; Farber, J. M.; Malik, N.; Sanders, G. *Int. J. Food Microbiol.* 1999, 52 (1/2), 39—45.
- Zhang, P.; Fawcett, N. C.; Craven, R. D.; Evans, J. A. 5th Internet World Congress on Biomedical Sciences at McMaster University, Canada 1998. www.mcmaster.ca/in-abis98/cellbio/zhang0791.

(张 辉 译)





无菌操作及其工艺验证

James P. Agalloco

Agalloco & Associates, Belle Mead, New Jersey, U. S. A.

James E. Akers

Akers Kennedy & Associates, Kansas City, Missouri, U. S. A.

引言

无菌操作是广泛运用于医药行业制备无菌产品的方法。制药工业的无菌操作是指在专门的洁净环境中组装已灭菌的部件和产品。洁净的环境可能是按人们常规划分的清洁室或环境,通过设计,减少(或尽可能消除)人类直接接触正在无菌组装的产品和部件,来进一步降低污染的可能性。无菌条件下生产无菌产品的想法仍存在内在的矛盾,理论上无菌的产品即使应用当代最先进的技术也不能做到无菌生产。然而,每天都有数百万剂量的假定为无菌的产品使用无菌技术生产出来,而在字面意义上无菌技术是难以达到无菌的。无菌产品是指没有任何生物,不论是生长或孢子状态。这是绝对的条件,不能部分或接近无菌,哪怕只有一个活菌也表示产品和生产该产品的系统(环境、设备及工艺)的失败。在无菌状态下生产的无菌灌装产品不能确定为“无菌”。无菌状态通常定义为无活病原菌存在的环境。

将经典的定义放在一边,人们必须考虑建立无菌环境的实际困难。设法创造一个无任何有机体的环境,从业者面临着无法克服的困难。在此环境中(除非隔离体)操作人员必须具备履行关键性的职能。假如操作人员被认为是无菌操作中微生物污染的最大单一来源,问题就更为严重。最近的实验表明,操作人员在新的无菌室换衣服,脱落活菌的比例大约是每10 000个无活性微粒就有1个活菌。在最合理着装并有意地缓慢移动中,操作人员会脱落微粒和活菌。因此,人体负荷的微生物污染会释放到常规的洁净室,这种可能性在任何合理的长操作周期内均存在。考虑到这一事实,还如何能做到真正无菌或甚至无菌环境?尤其要考虑到许多非致病生物体在某些情况下会转为病原性。这些情况包括患者健康状况不佳,或者因为越来越普遍的与年龄或原有状况相关的免疫力缺乏。

除了显然要考虑合适的设施设计、灭菌验证和灭菌工艺(全部都在本百科全书的其他部分讨论)、必须操作人员及其操作。这些行为广义上称为无菌技术,并如同所有人类行为一样,以各种不同的方式来实现。为了更好地了解无菌技术,一些通用指南以及优秀和不佳的技术事例可以用来说明应该做什么、不应该做什么。

任何无菌操作的基本概念都是非无菌物体决不能接触到无菌产品。这往往需要建立无菌区域,而核心活动即在

此处开展。所有操作者的无菌工作服的表面必须始终认为是非无菌的。非无菌的物体包括操作者的手,绝不能将其放于空气源和无菌产品之间。操作者的手和手臂必须始终放置于敞开的产品容器平面之下。已灭菌的组件在任何情况下都不应用戴手套的手直接接触,而应使用无菌工具。既然戴手套的手和手臂将进入无菌区域,就绝不能触摸墙壁、地板、门等。紧张地提起和移动水槽和手推车等工作不能由指定在无菌区及其附近工作的操作人员完成,因为活动越频繁,粒子的产生水平就越高,并且至少一些从操作人员身上释放的微粒的确为活微生物。

以下是一些避免污染的技巧:接近暴露的无菌产品时做一些调整再绕过它们;用戴手套的手纠正有塞子加料问题;触摸脸、眼睑或其他任何非无菌体需戴手套;在敞开容器上方直接进行空气抽样;要始终站在无菌区内;用戴手套的手将聚集的组件分散。所有这些操作都避免无菌物体置于可能来自人员污染的危险中。当然还有更多的超出我们想象的污染无菌区的途径。因此,在无菌区及其附近的操作必须仔细确认并由所有人员严格执行。这些操作应遵循上述原则,用介质灌装的模拟实验来评价,并在无菌操作中以相同形式执行。以书面形式规定每项操作的执行,并在这些具体操作中对操作人员进行培训是有益的。

最坏的情况

假如不提及“最坏情况”,那么无菌操作工艺验证的讨论就是不完整的。正如FDA最初规定的,“最坏情况”包括考虑人员数量、温度、相对湿度和其他方面^[1]。这方面已被企业经过一定的修改后被采纳,它包括一些但并非所有的FDA指南。企业一些较常见的最坏情况包括:人员数量、容器最长保存时间和灌装前的其他事项,操作时介入的数量和类型。确定无菌操作最坏的情况在很大程度上取决于直觉和高度的主观性。如果要确定失败的实际模式并将其分类,定量的危险性分析是很少的。因此,进行测试的最坏情况是由优先顺序而不是实际数据确定的。试验中最重要的最坏情形,是采用微生物培养基本身。因为大部分无菌制剂含有防腐剂,一些产品本身抑制或不支持微生物生长,培养基实质上代表了更有利微生物生存的环境。无菌工艺验证方案应说明最坏情形已经纳入到实验计划的何处。在整个文件中,列出假定的最坏情况,并对验证工作的确定有所选择。



先决条件

验证无菌工艺前应先对不同系统进行正式验证，这有助于保证产出物料的无菌性。实质上，这些系统包括设施、HVAC 系统、与接触产品的表面消毒程序、设备、部件和产品、工作服的卫生消毒和操作人员。仅列出必须完成的活动，用以表明在准备无菌工艺验证时所努力的程度。有时候急于开始验证，而这些任务依然在进行中，特别当考虑到公认的在无菌操作中微生物污染的主要来源为着工作服且在活动中的人员时（表 1）。

表 1 无菌操作中微生物污染的最可能来源^[2]

1. 人员携带的污染
2. 人为错误
3. 无菌操作中非常规操作
4. 使用前无菌设备的装配
5. 机械故障
6. 消毒不充分或不适当
7. 在 APA 内物料的转移
8. 在无菌操作中的常规操作
9. 空气传播的污染
10. 表面污染
11. 消毒过滤器的故障
12. 高效粒子空气过滤器的故障
13. 不充分或不适当的灭菌

应当明确，实质上，条款中前面几项由操作人员去执行或去更正，并充分认识到其他因素的影响都是次要的。然而，在完成支持程序和系统的验证前，继续无菌工艺验证的程序会增加不必要的失败的危险，并且几乎不可能对失败进行令人满意的分析。显然，由于人体携带的污染是一个极危险因素，因此操作人员的培训和资质对验证过程来说是重要的前提条件。然而，为了能快速推进验证，许多企业不注重培训，有的甚至减少人员培训。幸运的是所需的各种验证都有翔实的文献资料，操作人员应该很容易就能找到各种关于其操作的资料^[3]。

法规和历史观念

无菌操作是通过微生物生长培养基代替产品的模拟实验来评估的。操作完成后将培养基进行培养，以评估使用的工艺。当用于评价无菌灌装时，更为狭义定义为作为验证无菌装配过程的手段，涉及微生物生长营养培养基的使用，用于模拟无菌产品的灌装^[4]。这一技术最早由 Rhode 于 20 世纪 40 年代晚期首次使用，并在 20 世纪 70 年代中期被纳入了世界卫生组织指南^[5]。在 80 年代末，PDA 制订了最早用介质填充作评估无菌工艺的指南之一^[6]，几年后 FDA 首次明确了无菌操作的要求^[7]。其他的指南也由其他明确所需行为的管理当局和药典制定^[8~12]。最新的 PDA 指

导性文件提供可能最全面的工艺模拟试验信息来源^[13,14]。由于想要评价无菌工艺而非无菌药物灌装，人们有时采纳经典的培养基填充试验，因此工艺模拟实验已经流行起来，用于更广泛的无菌实验操作。工艺模拟实验可以说是一种评价无菌操作过程中采用接近无菌的材料充当适当安慰剂的手段^[15]。如前所述，评价无菌操作最重要的是必须进行必要的干预。任何一项工艺模拟若没有适当的评价员工的无菌操作技术，并且没有全面考虑过程中人员接触，那么在技术上就是无效的。

工艺模拟中培养基灌装的技巧

实施无菌工艺验证通常需要使用微生物生长培养基代替产品，PDA/PhRMA 工作小组的 Validation of Sterile Bulk Processes（无菌工艺的验证）描述了一些工艺模拟方法，这些方法不需要使用培养基（稍后讨论这个问题），但除了大部分应用外，工艺模拟试验实际上已成为培养基灌装的同义词^[16]。

1. 培养基的灭菌

培养基灌装从液体培养基的灭菌开始。这既可将液体培养基置于玻璃或不锈钢的大容器进行整体消毒，也可以用除菌级别的滤器滤过。灭菌方法的选择基于所需的培养基的量、生长促进需求、培养基的过滤速度。假定培养基的加入在所模拟的生产过程灭菌之时或之前，灭菌方法的选择是不受限制的。无论培养基是采用过滤除菌还是蒸汽灭菌，要求与产品灭菌方法相同的方式是没有必要的。通常建议，培养基灌装试验可以用于验证制剂生物负载的控制和验证过滤工艺；然而，事实并非如此，因为已经指出，培养基的生长促进作用和物理特性远远不同于几乎所有制剂。无菌验证的确立不依赖于工艺模拟，并且适于肯定所用方法的正确性。

2. 生产

灭菌培养基一旦到位，模拟试验就能开始，这时无菌操作的步骤就开始进行直至得到结论。在许多时候，模拟试验需要将产品灌入最终容器中，并能说明其常用的名称——培养基灌装。总之，培养基灌装是无菌工艺验证所要求的，略掉了许多人为的干预，而这在生产和灌装前的活动中则可能发生。在物料无菌后，许多无菌剂型需要进行大量复杂的无菌处理。混悬液、乳液、软膏剂、植入剂和脂质体是较常见的工艺例子，无菌操作的活动不包括容器的灌装。在许多普通无菌溶液的生产中，还有许多生产活动，如取样和过滤器完整性测试，可能会使无菌材料暴露而导致污染。因此，工艺模拟要包括所有的这些预灌装，来模拟无菌物料的常规生产。理解这些附加的要求，就能清楚地了解工艺模拟更适合说明这些活动，因此已成为流行，而培养基灌装则限制较大。评价无菌生产活动可以用多种方法进行，不依赖于灌装工艺^[17]。如果作为整个灌装

的一部分进行,那么对被灌装容器的评价则作为无菌生产和灌装的检验。

无菌药品的大规模生产,如抗生素、皮质醇类、胰岛素和一些生物技术产品,要求在无菌条件下进行大量的工艺步骤。这些工艺可以采用类似于评价无菌灌装工艺的方法进行评价。PDA/PhRMA 工作组对此已制订了明确的指导性文件^[18]。

3. 无菌灌装

采用与生产无菌产品相同的方法将培养基灌入无菌容器中。已有很多文献和一些工业实践的调研对此进行了研究^[19~25]。必须关注的是无菌灌装工艺本身的特殊性。能生产的无菌剂型的范围,包括容器类型、容器大小、处方、批量、灌装速度及其他方面的改变,这些方面都应包括在验证方案的设计中。所有这些都必须仔细考虑,以明确验证程序的要求,验证方案中要包括选择试验条件的合理性。稍后会就一些专题进行简短的讨论,并提出一些实施方面的建议。尽管讨论的焦点是模拟容器灌装,但是很多都与无菌原料的生产和无菌制剂的调配有关。

4. 与生产相关的考虑事项

4.1 容器的类型

无菌产品被无菌地灌入各种容器中,包括玻璃瓶和塑料瓶、金属管和塑料管、安瓿和塑料袋。容器不同,无菌灌装前准备的方法也不同。当一条灌装线用于灌装不同类型的容器时,灭菌和处理的的不同,要求每种类型都单独进行评估。当使用不同的灭菌方法、操作和密封方式,试图找出最坏的情况是十分困难的。使用始终有效的容器替代品能得到最有效最易理解的结果。例如,在密闭加液和密封不受影响的前提下,采用尺寸一致的透明容器取代不透明的容器。

4.2 产品类型

工艺模拟应包括整个灌装过程的所用工序。因此,对冻干制剂,冷冻干燥机的无菌装载就应该是模拟的一部分。混悬剂的灌装机使用循环管路,验证时的设置应与其一致,即使培养基的灌装没有必要这样设置。类似的,粉末灌装工艺的验证必须采用空白材料通过粉末处理系统灌装到容器中。研究空白材料,以确保空白与培养基的比例在两者混合后不会支持微生物生长。对模拟的产品而言,任何特定的灌装或处理活动必须是培养基灌装的一部分。增加附加的步骤,如在粉末的灌装工艺中,增加液体灌装,以便直接培养灌装好的制剂,也是可接受的。相对于产品的灌装,这些额外的步骤可能增加工艺模拟中已灌装制剂的污染的可能性,但是这种步骤的增加通常是不可避免的,并代表该工艺中附加的最坏情况的挑战。在一些例子中,使用控制制剂的灌装,如灌装了液体培养基的安瓿,而不是空白粉末,作为评估这些附加步骤可能是有益的,而这些

附加步骤并不是无菌灌装工艺的常规部分^[26]。

在复杂工艺中,整个工艺的模拟可以分成几步。假设步骤重叠,那就可以覆盖整个过程,并考虑将污染隔绝在一个特殊部分。冷冻干燥通常采用此方法,大量的玻璃瓶可以灌装、封口,不转移到冷冻干燥机中,作为区分污染来源于无菌灌装与来源于冷冻干燥机装载和冻干过程的方法^[27]。更常见产品类型的详细建议能在 PDA 最新的工艺模拟测试文献中找到^[28]。

4.3 灌装速度

验证计划必须考虑生产线的极限灌装速度。使用最慢的正常灌装速度可能会增加周围环境沉降物污染的进入。使用最快的正常速度可能会通过增加常规和非常规生产线干扰次数,从而增加人员干扰的可能性。灌装速度的可能影响取决于人员数量、人员接近无菌区和干扰的次数。必须建立工艺模拟策略选择理论。例如,在最初的灌装线验证中,一次在最慢的速度灌装,两次在最快的速度。在对生产线常规评价时,速度则为交替。

4.4 容器尺寸

对灌装容器尺寸的考虑与灌装速度相似。最大的容器(由于灌装容积大,通常以最慢的速度灌装)通常开口最大,因此周围环境中的微生物进入的可能性也最大。另一方面,最小容器(由于其容量的优点,通常以最大速度灌装)代表了最大的操作难度。小容器通常比较脆弱,不稳定,因此更容易在设备中破裂或卡住设备。任何需要额外操作步骤的容器,或更易于破裂或不稳定的容器都应包括在验证计划中,因为较之生产线中最大或最小容器这对无菌工艺是更大的挑战。就其本身而言,这可能是额外的最坏情况。

4.5 密闭系统

产品间最常见的差别之一是密闭系统。密闭系统是为处方的相容性而选择的,在某些情况中,处方的差异可能导致操作困难的不同。易于在活塞轨道中成团或卡住的塞子需要更加注意,由于不是其他大小相似的塞子都出现这种情况,因此被认为是最坏的情况。有许多为无菌灌装的药品输送而专门设计的密闭系统,由于这些系统具有密封的间隙,而间隙可能在用药时与产品接触,产品结构的模拟过程必须包括这个间隙,应允许培养基在培养时接触这些表面。

4.6 灌装容量

灌装入容器的培养基体积无需是容器的常规灌装容量。培养基必须要有足够大的体积以接触容器封口表面,并且培养后易于检查灌装的样品。尽管灌装容量可以较小,但灌装速度必须与模拟产品的常规灌装相匹配。小型容器不需要灌注过满,因为在容器顶部必须留有足够的空气以帮助需氧有机物的生长。假如液体培养基注满整个容器,就

会出现问题。

5. 灌装过程相关的考虑事项

5.1 灌装线

考虑到容器排列的数量, 密闭系统和必须包括在工艺模拟过程中的其他产品属性, 显然只有在最简单情况下, 一次单独的培养基灌装足够覆盖所有的无菌操作。当在厂房中存在多条线时, 每条线都应独立考虑。一条线的工艺模拟结果对另一条线没有预见性, 因为污染的程度主要取决于操作人员的行为。即使是在两个设计标准相同的洁净房间内的同一设备, 也不会产生同样的结果, 除非操作人员的无菌操作技术处于同一水平。

5.2 灌装的持续时间

培养基灌装的持续时间是颇有争议性的问题之一。通常培养基的灌装必须足够长, 以便包含所有要求的干扰。因此, 典型的培养基灌装可能至少要 3~4h。理想的培养基灌装必须比模拟的产品的产量更多。这个方法对于批产量达到 5000 个的情况适用。随着每批产量的增加, 目前至少灌装 5000 个, 且数量也随批量的增加而增加。对于批量特别大的情况, 或灌装时间很长的情况, 如吹/灌/封或隔离系统, 培养基灌装与空白制剂(空的, 或者用水装满)混合进行, 用来维持模拟过程的操作环境。完成后, 在所有计划中的常规与非常规干扰前后, 灌装培养基。在任何计划外的非常规干扰后转化为培养基(见以下部分)。混入空白制剂的培养基灌装是一种技术, 该技术用于运行数天的验证过程。此时, 在一开始进行培养基灌装以评价装配, 结束时再灌装以评价工艺在最长时间的全程运行后保持无菌的能力。即使高速灌装机尽可能灌装大量样品, 也不能代替实际工艺模拟。高速灌装机可以在少于 15min 的时间内灌装 5000 或更多的剂量, 但那很难认为是可接受的操作。

5.3 干预

事实上, 在所有无菌操作中, 都少不了操作员来完成操作。了解所需的人员干预类型, 以及如何将其加到验证计划, 是确定验证方案所必需的。

无菌装备: 第一次的干预是准备无菌操作的装备。包括从高压灭菌器中取出灭菌的物料和设备部件, 移至无菌操作区。随后是设备装配准备的过程。将已灭菌的部件从保护材料中取出, 安装和调节, 以准备无菌操作。这一步也许是所有操作中最有细菌侵入性的。操作员必须在执行任务时一丝不苟, 以避免任何接触产品表面的污染。严格遵守前述的无菌技术原则是至关重要的。这些干预是每个无菌操作的必要部分, 通常确认首先灌注的容器, 该容器更能显示无菌设备的潜在问题。因此, 验证计划必须包括设备安装后即刻灌注容器的工艺模拟。

常规干预: 执行无菌操作一般要求一系列重复的活动:

如产品和部件的补充, 质量的核对, 操作员的中断和环境监测。这里的每一步都是工艺所需的一部分, 不能省略。它们应包括在工艺模拟中, 并由操作员以相同方式并使用确定的方法和操作完成。

非常规干预: 在无菌灌装过程中, 可能要求非常规或纠正的干预。通常与组件或设备方面的困难有关。容器在传送装置上破裂、卡住, 或从转盘上掉下来。塞子可能会在轨道中卡住、在容器中黏在一起或位置错位。设备的可能问题包括: 质量调整、少量溢出、传感器的不工作或调节不当。以上每一种情况均需要操作人员进行纠正使生产线恢复到正常。不同于常规干预, 这些并不是每个工艺过程所要求的操作, 但是为了评估它们对无菌操作潜在的影响, 每个培养基灌装中都应包括这些更普遍的干预。就非常规干预来说, 可重复考虑, 如质量的调节、塞子的堵塞等, 正确的操作应当在操作规程中加以描述, 操作员应严格执行。非常规的介入可随机发生, 或在整个无菌灌装过程中一次也不发生。为确保它们是工艺模拟的一部分, 必须好像它们是模拟要求的一部分加以完成。因此, 即使整个模拟灌装的质量都正确, 也要停止生产线, 并加以调整来证明使用方法的可行性。可以假定一批中非常规介入的程度, 但全部加以模拟则是不可能的。模拟方案应引导企业确定更普遍的要求。企业应协同努力, 最大限度地减小非常规干预的数量和程度。通过对新组件严格的质量合格标准来提高组件质量, 严格控制准备工作、设备的修理或升级以及类似的活动, 是可能达到减少介入的目的。这些措施实质上有助于工艺的可靠性和患者的安全性。

新的介入: 在批生产或工艺模拟时, 可能会发生在先前的模拟过程中没有评估过的干预。企业应该允许这种可能发生的情况, 并在执行中通过管理监测来评估此干预, 考虑在随后的培养基灌装中进一步评估新的干预。

干预的文件化: 在标准操作规程(SOP)中对给定的无菌操作确定允许的干预的细节是有益的。这个规定消除了关于什么是允许的任何主观性, 并且建立实施干预的明确的途径。此 SOP 可用于培训操作员, 并作为常规无菌操作和模拟工艺的指南。常规操作和工艺模拟操作的文件应包括表现干预(常规和非常规)的细节。罗列出常规灌装中所要求的干预, 有助于通过建立更普遍的程序, 给予优先, 以确定培养基灌装程序。所要求的干预也能用作在无菌操作中改善程序、组件和设备的起始评价。如果在工艺模拟中缺少这些文件, 在常规操作中很难保证干预的可接收性。使用录像带不仅可以记录培养基灌装过程, 还可以用来培训员工, 这正变得越来越流行。

6. 环境的考虑事项

6.1 环境监测

无菌操作活动通常由在近似操作中监测环境空气和表面所支持。监测的目的是确定整个工艺操作中环境的可接收性。有许多适合此目的的环境取样的方法, 每一种都有

其特殊的优点和缺点^[29,30]。也有许多法规和药典的参考文献,对无菌操作环境所允许的微生物水平有描述^[31~34]。每一个文件均有明确的无菌操作的微生物环境,在此环境下的操作存在微小的差异。在尽力同时遵从所有的要求时可能会有问题,但自从FDA的无菌操作指导出台,无菌操作能力充分提高。曾被证明很恐怖的微生物限度现在在大部分无菌操作应用中常见。20年前在此行业时兴谈论确定环境监测结果趋势的重要性。时至今日,此趋势公认不再存在,在关键地方出现可探测微生物是罕见的事件^[35]。由于这接近常规的重要操作,改变与无菌操作相关环境监测性能的相关范例是必需的:

- 环境取样系统的敏感性可能不足以在关键地方以任何准确度监测微生物;
- 增加取样来检测低水平微生物量是不可能成功的,并且事实上可能由于在无菌区增加人员介入而使产品处于危险之中;
- 设备和组件的质量提高到一定程度后,环境监测可能是在无菌操作最具侵入性的介入(非期望状况);
- 在从关键环境、灭菌实验或工艺模拟中灌装的容器中取样,检测到任何污染都变得罕见。

考虑到这些观点,环境监测必须以新视角看待。下面的见解可能对从业者有所帮助:

- 解释新开业医生所立的誓约,环境监测的第一准则是无害。检测微生物的取样不应增加无菌材料污染的可能。
- 关于无菌产品的容器灌装,没有确定可以接受的取样量。
- 取样和微生物计数可能比无菌操作本身更易于造成污染。
- 在环境中发现可回收有机体是随机的,可能与整个无菌区的完整性或在生产的无菌产品没有关系。实际上,有操作员(包括执行取样的个人)存在,怎么能期望不发生偶然的污染呢?
- 没有“冒烟的枪”,要确定无菌试验失败的隔离、培养基灌装污染和环境隔离之间的关联十分困难。

尽管有几分负面作用,环境仍然要监测,微生物要控制在再确认连续的可接受环境条件的水平内。空气取样,不论主动的还是被动的取样方法,必须在工艺操作中执行。表面取样最好在无菌操作完成后做,以防止在过程中不慎污染产品表面。大部分取得的样品必须避免污染;然而,在操作后样品接触面偶然检测到可回收有机体不应引起不相称的警报。环境的取样也是一个无菌操作,有自己的瑕疵。

6.2 人员监测

操作人员的微生物污染评估是整个计划的必需部分。取样的考虑应与环境空气和表面相似。在此范围内,只在无菌操作的结束时从手或其他工作服表面取样。建议对操作员的取样在无菌区的出口处进行。不同于环境空气和表面的取样,期望所有的这些样品都没有可检测的有机体是

不现实的;但是应始终满足为其确立的限度。如若检测结果反复表明不能满足所期望的微生物水平,则必须采取措施纠正。采取的措施包括再教育、无菌操作再评估和重新着装认证(见下文)。正在进行纠正的人员只能在无菌区以外进行操作,直到其行为可以接受。

7. 人员的考虑事项

7.1 预备培训

一些公司采取了专门的无菌操作练习来评价人员,并对首次进入无菌操作的人员进行必要的准备。这些测试有手工灌装、转移培养基和专为无机械设备的无菌技术设计的其他操作。只有成功完成手工操作后,才考虑将员工进一步培训成无菌操作员。无论这种评价是否进行,广泛认为,在允许新人员在批生产中完成这些相同操作前,他们必须积极参加培养基灌装。在微生物学、无菌技术、着装、设备操作和cGMP等方面,额外的讲座和人员培训示范也是必需的。

7.2 着装认证

无菌操作区工作的人员通常要进行最初及定期的着装认证。着装的认证包括多种工作服表面的取样及在常规监测中的一般评价^[36]。在允许新人员进入无菌车间之前,他们必须成功地认证3次。每年或半年取样,再次确认工作人员仍然能正确着装。着装认证通常可扩展到其他人员,如管理人员、维修人员以及必须进入无菌区的清洁人员,但他们不直接参与无菌产品生产的相关操作。

7.3 人员的参与

事实上,所有无菌操作的运行都需要操作员的积极参与,要求操作人员执行重要的任务,即在操作中避免污染无菌物料、组件和表面。他们能否成功完成这些任务通过其在工艺模拟过程中的常规和非常规介入操作来评价,这些介入使其参与无菌工艺。为了确保每个操作员能胜任他们的工作,定期参加模拟操作是必需的。装配和生产线的操作员每年必须至少参加一次工艺模拟操作。其他的如生产线机械和环境取样人员必须以相同方式管理。参与不仅仅是要求在近似无菌操作中出现,并且必须包括他们积极执行正常指定的介入。管理人员和其他人员,如不从事无菌介入相关操作的检修员,不需要考虑在认证过程中。

在FDA公布无菌操作指南中,有关人员的一个担心与在无菌操作区的最大限度的占有空间有关^[37]。实现该规定的简单方法是对每一个房间指定最大空间。工艺模拟在此人员数量上进行,并在常规操作时遵循操作规程,当房间里有最大数量的人员存在时,一个人出去后另一个人才能进入。

当公司实行多班制时,第二班和第三班也必须包括在计划中,同时也要证明他们操作的可取性。一个有很多人、多条灌装线并确保只有参与相关的培养基灌装的人员

才能进行无菌操作,这样的管理是一个复杂的任务。

8. 培养基的考虑事项

8.1 培养基的选择

选择工艺模拟中使用的培养基,要考虑在环境中可能发现的有机体,重点是源于操作人员的污染。考虑到这些,常规的选择是能在宽范围生长的常见需氧微生物的通用培养基^[38]。常用的是大豆消化酪素琼脂培养基,也称为胰酶大豆肉汤,与无菌试验的培养基相同。在有些情况中,也使用其他的培养基。如果灌装是在隔离的充氮的环境下进行,为了模拟,厌氧培养基如硫代硫酸盐培养基可能更为合适。

8.2 厌氧培养基的使用

非口服制剂的无菌测试包括需氧和厌氧培养基的试验。在20世纪70年代中期,培养基灌装在工业中普及起来,使用厌氧培养基被认为是每一个无菌工艺验证项目的标准部分^[39]。近年来的操作经验表明,在正常有人操纵的灌装线下建立真实的厌氧环境相当困难,以至于其操作不再普遍^[40]。意识到在洁净室中微生物的主要来源是人员,除了特殊情况,厌氧培养基的灌装是无保证的。此外,厌氧培养基的灌装在任何现行的法规中都没有被要求,同时也意识到问题集中在人员产生的能在空气中存活的污染上。

8.3 培养基培养的条件

在培养基灌装的工业操作中有一个地方特别有分歧,那就是培养的条件^[41]。在各种温度下进行培养的论点均有说服力。一些厂商仅使用单一的温度,范围在20~35℃。有些厂商选择在20~25℃下培养7d,然后转移到30~35℃的灌装容器中。另外几乎有相同数量的厂商选择在30~35℃培养7d,然后转移到20~25℃的灌装容器中。意见不一致表明培养条件的选择可能很少受到关注。采用的条件是否合适,无论这些条件是什么,都必须通过促进微生物生长的研究而确定(见下文)。培养时间是不变的,一般为14d^[42]。

8.4 培养基生长促进

在使用合适培养基的所有讨论中,厌氧培养基灌装的需要,选择培养条件和支持所有在这方面决定的中心议题是生长促进研究。这些选择最终确定了在模拟操作中使用培养基能成功地支持微生物的生长。常规的做法是测试针对一组有机体的培养基,如枯草杆菌、白色念珠菌、绿脓杆菌、表皮葡萄球菌和黑曲霉。在生长促进实验中极为推荐使用一种或两种最常用的环境隔离群,因为在受污染的制剂中很可能会碰到它们。如果挑战有机体不能在培养基灌装中生长,应重复进行培养基灌装。在培养基的挑战中,将粉末加入到培养基中,研究显示可接受的生长促进是必要的^[43]。抗生素产品的工艺模拟中使用的培养基有时需要添加钝化酶,这样可以获得合适的生长促进结果,因

为即使痕量的抗生素也能抑制某些有机体的生长。

可接受标准

过去的20~30年,在验证无菌操作中,没有什么比选择使用可接受标准更具有争议性。20世纪60年代WHO公布了第一部培养基灌装的法规要求,并且标准为0.3%。因此,超过1000剂量的培养基灌装,在培养后如果发现不超过3个剂量被污染,则被认为是可接受的^[44]。这个限制持续到80年代早期,PDA起草了第一份关于无菌操作的指南^[45]。PDA的文件利用当时的由PMA完成的第一个无菌操作方面的调查,建议标准为灌装剂量的0.1%^[46]。这个建议在当时被认为是相当激进的,因为这显然大幅度提高了要求。当时美国食品和药品监督管理局的Ronald Tetzlaff对此限度确定做了解释说明^[47,48]。在解释中引用了PDA的第二份关于无菌操作的验证的建议,在这份建议中使用泊松分布描述大批量生产中的污染^[49]。FDA的第一份官方的关于无菌操作模拟操作的可接受标准是在1987年的无菌操作指南上描述的^[50]。FDA的指南中阐述到:“测试结果高度可信性表明,产品在无菌操作过程中被污染的可能性很小。总的来说,试验结果显示污染的可能性1000中不超过1,是可以接受的。”随着这份文件的公开,PDA1980限度再度被采用,目前依然是FDA的法定限度。PDA通过1986年和1992年的工业调查继续开展无菌操作方面的工作^[51,52],这些努力确定了工业操作不断完善,并且在工业上,全球普遍接受了0.1%的标准。注射剂学会(TPS)起草了有关无菌操作评价的第一个指南,比先前的文件更强调对可接受标准进行统计处理^[53]。这份文件深刻地影响了正在准备的ISO的文件,并且产生了一个新争论^[54]。这些文件上对统计数据的强调造成了许多不便。数学上更正了可取标准的范围,以包括更大范围的灌装剂量数,形成了对统计方法的认识,这种方法在以前没有使用过。统计学内在的特点就是随着培养基灌装剂量数的增加,允许的污染数随之增加。1000个剂量中有1个被污染似乎是可以接受的,在统计上相当于16970个剂量中有10个被污染。然而,如此众多的阳性结果在任何大小的批次中都不能接受。在1996年出版的正式EU指南中第一次带有关于无菌药品的附件1^[55]。附件建议“在95%的置信区间污染率应低于0.1%。”这个标准并不具体。因此,尽管这个限度是精确的统计,但TPS和ISO的作用却没有提及。对TPS和ISO统计数据处理的最明确的回应是PDA作出的^[56]。PDA指南阐明如下:“尽管在工艺模拟试验中有灌装剂量的数量或允许的阳性数量,但是在任何模拟测试中阳性数目的最终目标应是零。毕竟,灭菌产品是不含有活的有机体的。”PDA最初引入了泊松分布理论的方法来评价培养基灌装,矫正了其先前的看法,但现在却认为数据的统计处理是无效的。用泊松分布理论来评价随机事件的低概率是合适的,并且不再认为与在无菌操作中无菌材料如何污染相一致。当第一次引入时,假定无菌操作的污染有各种来源,任何



说明随机事件的概率的统计方法却是合适的。随着进行更多的培养基灌装、工厂和设备的大幅度改良,以及认识到微生物污染是人员造成的,观点已大为改变。广为持有的观点是无菌操作的污染是人员带来的,来源于对必需的介入不恰当的操作。因此,污染就没有随机性,其起源已经知道,并且可确定的是,比以前更有可能消除。PDA 的观点代表了关于可接受标准的最新想法。PDA 最近的努力结果如表 2 所示。

表 2 PDA 关于无菌操作验证的可接受标准^[57]

试验方法必须尽可能模拟操作。

选择方法和限度的原理必须正当且有据可依。

试验方法必须足够灵敏以确认低工艺模拟测试污染率,并且选择的限度必须常规操作可完成。

任何阳性结果都显示潜在的问题,不管运行规模的大小。

所有阳性结果都必须加以鉴别,并且必须进行彻底的有记录的调查。

在设计良好的无菌厂房中,吹瓶-灌装-封口和成型-灌装-封口和隔离系统中使用自动化生产线的工艺模拟试验污染率必须接近于零。

在旧厂房或使用大量产品的操作或手工操作中,不可能取得接近于零的污染率。那么,这些模拟操作的污染率,当灌装 3000 剂量时,1000 个中不超过 1 个。

当灌装量小于 3000 剂量时,工艺模拟试验必须至少等于批量。由于小批次的低敏感性,不允许出现阳性结果。

若灌装量大于 3000 剂量,当通过外推法增加允许的阳性数量时,必须谨慎。

CEN 和 PIC 起草的出版物也为无菌操作的验证提供了可接受标准^[58,59]。它试图调和 ISO 文件和 PDA 指南间的差异。这些文件的要点如下:“理论上,污染率应为零。然而,目前所接受的污染率必须是在 95% 的置信区间下小于 0.1%。”这显示其致力于这两种方法,但实际上这两种观点是否可以简单地调和还不清楚。

关于无菌操作最新的工业调查于 1997 年由 PDA 出版^[60],它试图讲述实际操作中限度的统计特点,然而,在此方面对此问题的反应是无确定结果的。这包括一些公司采取比 0.1% 更为严格的可接受标准,这显示了新一轮可接受标准的定义为期不远了。关于可接受标准的最新注释在 USP 的 1116 草案中提出^[61]。USP 扩大了 PDA 1996 的观点,并且建立了更为严格的要求,“目标是零污染。单次运行 5000 个灌装剂量中,至多 1 个阳性。在连续 3 次灌装培养基中,2 次灌装培养基必须没有污染。”

也许建立一个可接受标准(或确定整个计划)最简单的方法是跟从别人,以最新的调查信息为基础制订公司整个无菌操作验证计划^[62]。很显然,无菌操作在过去 20 年里得到很大改善,并且公司应当持续地基于同行和法规的期望,监测其操作。过去所接受的现在则不被接受,并且毫无疑问,将来会有更为严格的标准。

技术的进步

无菌产品的生产至少得益于两种新的生产方法:吹瓶-灌装-封口和隔离技术。每种技术都能大大减少操作人员与无菌材料的接触。在吹瓶-灌装-封口(与成型-灌装-封口相似),产品容器的制成仅在灌装和封口前数秒钟进行。这比把容器暴露在人工无菌灌装环境的常规的灌装具有明显的优势。许多工艺模拟研究已经证明吹瓶-灌装-封口法比普通的洁净室更大程度上保护封口容器的内容物^[63~65]。隔离技术使用完全不同的方法得到相似的结果,此方法将人员从操作环境中隔离^[66,67]。隔离技术,由手套箱进化而来,使操作员在密封(物理或不同压差下)罩的外面,而无菌操作在密封罩内完成。箱内有无菌空气交换,以使内表面无微生物。该方法与消除直接人员的存在相结合,使隔离体成为无菌产品生产的理想工具^[68]。

无菌工艺的无菌保证

本章至此,给读者的印象是无菌工艺与培养基灌装及工艺模拟密切相关。事实上,模拟生产和常规生产的关系并非直接的。完全成功的培养基灌装程序除其自身外无法确保无菌。下一批,或前一批,可能是无菌的,也可能不是。在培养基灌装中没有出现污染只能证明厂房、人员和操作规程能够在该培养基灌装中防止污染。证明常规灌装的能力则完全不同,目前无法通过除每个灌装单位的破坏性的无菌实验之外的方法完成。最终,从业者只能推断,由于培养基灌装是成功的,那么在整个常规生产中也可能是成功的。通常的误解是 0.1% 或 1000 个剂量数中至多 1 个是无菌保证的水平。显然,事情不是这样的,这只是在工艺模拟中允许污染的最大量。确定无菌灌装产品的无菌保证水平是没有可接受的方法的,这可称为无菌产品的“圣杯”。我们进行培养基灌装来证明能力,并且在重要的限度内我们推断我们能使用无菌操作生产无菌产品。目前,这可能是最接近无菌操作的验证。尽管这是最基本的限制,但是培养基灌装代表了唯一的接近于进行无菌操作的方法。证明生产无菌产品的能力将必须满足工业的需要。

结论

成功的无菌操作需要非常接近常规生产的工艺模拟的研究。由于无菌操作生产的无菌产品的范围是很广泛的,这要求从业者准备将本章提供的基本指南纳入到其特定场合。模拟与生产越匹配,越能表明模拟的成功,也意味着常规操作的成功。良好的工艺模拟程序能带给公司在常规操作上的信心,这种信心是用其他方法无法获得的。

然而,考虑到现有的技术水平,尤其是人工无菌工艺,不确定性是固有的特点。由于 20 世纪 70 年代后期培养基灌装变成无菌操作的验证的标准特征,因此工艺模拟测试已公认为只是一时的应急方法。保证最终用户的安全性不



像成功的培养基灌装试验,“好”的环境监测结果和成功完成无菌试验那样简单。即使这些数据是令人满意的,不确定性因素也依然存在。虽然人类厌恶不确定性,尤其在数字价值被广泛陈述的领域,但是科学的合理性要求我们认识到无法试验或监测的不确定性。只有通过系统的培训,监测和降低人员产生的污染危害才有控制污染的可能性。幸运的是,从现有的正面数据(无相反的数据)可以确定,当按照现有工业标准生产时,无菌生产的卫生保健品是非常安全的。并且,随着工业生产的继续完善,我们的产品也将更为安全,可能某一天与无菌操作相关的不确定性将非常低,以至于我们能够认为这些产品真正无菌。

参考文献

- Guideline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing; FDA, 1987.
- Current Practices in the Validation of Aseptic Processing—1996, PDA Technical Report # 24. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1997, 51 (2).
- Carleton, F., Agalloco, J., Eds. Validation of Pharmaceutical Processes: Sterile Products; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1998.
- Process Simulation Testing for Aseptically Filled Products, PDA Technical Report # 22. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1996, 50 (6).
- General Requirements for the Sterility of Biological Substances; Part A, Section 2, Annex 4, WHO, 1973.
- Validation of Aseptic Filling for Solution Drug Products Technical Monograph; No. 2, 1980 PDA.
- Guide to Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing; FDA, 1987.
- Sterilization of Health Care Products—Aseptic Processing; Part 1 General Requirements ISO-13408-1. International Standards Organization, 1996.
- European Union Guide to Good Manufacturing Practice; Annex 1 on the Manufacture of Sterile Medicinal Products; European Commission, 1996.
- The Use of Process Simulation Tests in the Evaluation of Processes for the Manufacture of Sterile Products; Technical Monograph No. 4. The Parenteral Society, 1993.
- Recommendations on Validation of Aseptic Processes; CEN /TC 204WG 8 N 38. 1998.
- Recommendations on Validation of Aseptic Processes; PIC/S, PE002-1; 1999.
- Process Simulation Testing for Aseptically Filled Products PDA Technical Report # 22. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1996, 50 (6).
- Process Simulation Testing for Sterile Bulk Pharmaceutical Chemicals PDA Technical Report # 28. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1998, 52 (4).
- Process Simulation Testing for Sterile Bulk Pharmaceutical Chemicals PDA Technical Report # 28. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1998, 52 (4).
- Process Simulation Testing for Sterile Bulk Pharmaceutical Chemicals PDA Technical Report # 28. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1998, 52 (4).
- Process Simulation Testing for Sterile Bulk Pharmaceutical Chemicals PDA Technical Report # 28. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1998, 52 (4).
- Prout, G. Validation and Routine Operation of a Sterile Dry Powder Facility. J. Parenteral Sci. Technol. 1982, 36 (5), 199—204.
- Tetzlaff, R. Aseptic Process Validation. Particulate & Microb. Control 1983, 2 (5), 24—38.
- Tetzlaff, R. Regulatory Aspects of Aseptic Processing. Pharm. Technol. 1984, 8 (11), 36, 40—44.
- Korczynski, M. Validation of Aseptic Process by Media Fills—Survey Report and Discussion Proceedings of the Second PMA Seminar Program on Validation of Sterile Manufacturing Processes, Aseptic Processing, PMA, 1979; 186—213.
- Agalloco, J.; Gordon, B. Current Practices in the Use of Media Fills in the Validation of Aseptic Processing. J. Parenteral Sci. Technol. 1987, 41 (4).
- Agalloco, J.; Akers, J. Current Practices in the Validation of Aseptic Processing — 1992. J. Parenteral Sci. Technol. 1993, 47 (2).
- Agalloco, J.; Akers, J. Current Practices in the Validation of Aseptic Processing — 1996, PDA Technical Report # 24. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1997, 51 (2).
- Process Simulation Testing for Aseptically Filled Products, PDA Technical Report # 22. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1996, 50 (6).
- Process Simulation Testing for Aseptically Filled Products, PDA Technical Report # 22. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1996, 50 (6).
- Process Simulation Testing for Aseptically Filled Products, PDA Technical Report # 22. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 1996, 50 (6).
- Fundamentals of a Microbiological Environmental Monitoring Program; Technical Report # 13, PDA, 1991.
- Akers, J.; Agalloco, J. Aseptic Processing—A Current Perspective. In Sterilization Technology; Morrissey, R., Phillips, G. B., Eds.; Van Nostrand Reinhold; New York, 1993.
- United States Pharmacopoeial Convention. In-Process Re-

- vision (1116) Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Environments, Pharmaceutical Forum, 1999.
32. Guideline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing, Food and Drug Administration, 1987.
33. European Union Guide to Good Manufacturing Practice; Annex 1 on the Manufacture of Sterile Medicinal Products, European Commission, 1995.
34. Aseptic Processing of Health Care Products; ISO/CD 13408.3; International Standards Organization, 1995.
35. Proceedings on the August 21, 2000 Environmental Monitoring & Aseptic Processing Symposium; PDA, 2000.
36. Proceedings on the August 21, 2000 Environmental Monitoring & Aseptic Processing Symposium; PDA, 2000.
37. Guideline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing; Food and Drug Administration, 1987.
38. Process Simulation Testing for Aseptically Filled Products, PDA Technical Report #22. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1996, 50 (6).
39. Korczynski, M. Validation of Aseptic Process by Media Fills—Survey Report and Discussion; Proceedings of the Second PMA Seminar Program on Validation of Sterile Manufacturing Processes: Aseptic Processing, PMA, 1979; 186—213
40. Agalloco, J.; Akers, J. Current Practices in the Validation of Aseptic Processing—1996, PDA Technical Report # 24. PDA J. of Pharm. Science and Technol. 1997, 51 (2).
41. Agalloco, J.; Akers, J. Current Practices in the Validation of Aseptic Processing—1996, PDA Technical Report # 24. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1997, 51 (2).
42. Agalloco, J.; Akers, J. Current Practices in the Validation of Aseptic Processing—1996, PDA Technical Report # 24. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1997, 51 (2).
43. Process Simulation Testing for Aseptically Filled Products, PDA Technical Report # 22. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1996, 50 (6).
44. General Requirements for the Sterility of Biological Substances; Part A, Section 2, Annex 4, WHO, Geneva, 1973.
45. Validation of Aseptic Filling for Solution Drug Products; Technical Monograph No. 2, PDA, Philadelphia, 1980.
46. Korczynski, M. Validation of Aseptic Process by Media Fills—Survey Report and Discussion; Proceedings of the Second PMA Seminar Program on Validation of Sterile Manufacturing Processes, Aseptic Processing, PMA, 1979; Washington, DC, 186—213.
47. Tetzlaff, R. Aseptic Process Validation. Particulate & Microbial Control 1983, 2 (5), 24—38.
48. Tetzlaff, R. Regulatory Aspects of Aseptic Processing. Pharmaceutical Technology 1984, 8 (11), 36, 40—44.
49. Validation of Aseptic Drug Powder Filling Processes; Technical Report No. 6, PDA, Philadelphia, 1984.
50. Guideline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing; FDA, 1987.
51. Agalloco, J.; Gordon, B. Current Practices in the Use of Media Fills in the Validation of Aseptic Processing. J. Parenteral Sci. Technol. 1987, 41 (4), 128—141.
52. Agalloco, J.; Akers, J. Current Practices in the Validation of Aseptic Processing—1992. J. Parenteral Sci. Technol. 1993, 47 (2).
53. The Use of Process Simulation Tests in the Evaluation of Processes for the Manufacture of Sterile Products; Technical Monograph No. 4, The Parenteral Society, Swindon, Wiltshire, UK, 1993.
54. Aseptic Processing of Health Care Products—Part 1; General Requirements; ISO/DIS 13408-1, ISO, Geneva, 1996.
55. EU Guide to Good Manufacturing Practice, Annex 1 on the Manufacture of Sterile Medicinal Products; European Commission, 1996.
56. Process Simulation Testing for Aseptically Filled Products, PDA Technical Report # 22. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1996, 50 (6).
57. Process Simulation Testing for Aseptically Filled Products, PDA Technical Report # 22. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1996, 50 (6).
58. Recommendations on Validation of Aseptic Processes; CEN /TC 204WG 8 N 38; 1998.
59. Recommendations on Validation of Aseptic Processes; PIC/S PE002-1, 1999.
60. Agalloco, J.; Akers, J. Current Practices in the Validation of Aseptic Processing—1996, PDA Technical Report # 24. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1997, 51 (2).
61. United States Pharmacopoeial Convention. In Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Environments; 1116, Pharmacopoeial Forum, 1999.
62. Agalloco, J.; Akers, J. Current Practices in the Validation of Aseptic Processing—1996, PDA Technical Report # 24. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1997, 51 (2).
63. Sharp, J. Manufacture of Sterile Pharmaceutical Products Using 'Blow-Fill-Seal' Technology. The Pharm. J. 1987, 239 (106), 22.
64. Sharp, J. Validation of a New Form-Fill-Seal Installation. Manufacturing Chemist 1988, 22.
65. Kvarnström A. C.; Ernerot L.; Mattsson K. In Form-Fill-Seal; Experience with the Aseptic Filling and Terminal Sterilization of Small Volume Parenterals; Proceed-

- ings of PDA International Congress, 1992, 180
66. Edwards L.; Porter M. In Microbiological and Physical Limits Testing of a Locally Controlled Environment (LCE) Prototype Filling System; Proceedings of PDA/ISPE Conference on Advanced Barrier Technology, 1995.
67. Sweeney M.; Davenport S.; Edwards L. Validation Issues for a Product Barrier/Isolator Sterile Liquid Filling System in a Controlled Environment; Proceedings of PDA/ISPE Conference on Advanced Barrier Technology, 1995.
68. Agalloco, J. Barriers, Isolators and Microbial Control. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1999, 53 (1).

(周晓丽 何 军 徐 喆 译)





无纸文档系统

Ellen M. Williams

Michael McKenna

Pfizer, Inc., New York, New York, U. S. A.

引言

文档的主要目的是信息交流,具体地说,文档增强了信息交流的灵活性。文档从两个方面改善消息传递的能力,一是将发送人的信息及时固定,供后来读取。例如,洞穴壁上刻绘的古代石壁画、雕刻的石片、洞穴壁的照片、含有购货单的纸袋,以及记录了钢琴协奏曲的唱片,都记录了信息,这些信息在创作后一直流传下去。文档使得信息交流更多种多样的同时,允许发送人的信息在不依赖于发送人的空间流传。除了洞穴壁,上述的例子或多或少均是可移动的,正是可移动性赋予文档跨越空间和时间传播的能力。

将发送人的信息进行包装,一旦记录后,物理上分散的收件人在任何时候都能读取,文档能促使奇迹发生。当发送人和收件人之间无法进行实时的信息交换时,一件有形的记录能给思想以生命。如果只说一次或只做一次,则不会有这样的效果。政府、宗教和许多社会主要依赖于某些重要文档的不间断的交换^[1]。在更小、更直接的规模上,文档能使我们利用仅口头表达无法实现的方式和规模干成事。的确,文档允许我们跨越巨大的时间与空间沟通,从而增强了信息交流的协调性和范围,使得协作能取得巨大的成果。

比起其他工业,药品制造和销售更依赖于不同领域的高水平的协作,从分析化学到临床医学、运筹学、商业和法律。这种复杂的协调和严格的管理特色,最终决定了药品的生命力,要求所有的科学和商业决策,包括从新发现到上市后研究都必须严格和彻底地用文档记录。在单个产品的生命周期中要管理的书面的流程、表格、分析、报告和信件的数量是巨大的,考虑到整个企业有几十个处于不同开发阶段的药物,文档管理的量是惊人的。尽管当局最近针对电子记录管理颁发了全面的法规^[2~4]和指南^[5~7],这些标准及其基本规则可能会随着计算机技术和无线数据交换技术的发展而迅速落伍^[8]。

直到最近,企业文档管理一直在尽力控制三种纸型文档(表格、报告和手册),管理文件夹和执行档案存放程序^[9]。25年的大量的经济和科技力量改变了事务行为,使得传统的文档管理疲于应付,甚至完全过时。首先,机构和信息交流技术的进步压缩了生产周期,几乎减少了所有企业从概念到市场的时间,也导致对通信提速的需求和消费。信息交流和发送技术的进步不可避免地增加了业务量^[10]。加速上市导致更多业务,从而要求对更多文档进行

更有效的管理。在过去25年里,计算机技术已经引入商业环境,以适应加快的步调,系统设计管理纸型文档和存储电子文件遇到极大的困难^[11]。计算机和信息交流技术正在改变文档的基本状态。

文档编制技术的进展

最初,企业实行无纸文献编制系统,是取消纸张、节省物理空间、提高文档检索效率或改善信息存储的需求所驱使。纸型文档管理部门按文档的内容、目的或形式进行分类,并进行存储、修改和检索。关键是引入一个提供存储方案的系统,绝大部分电子文档管理系统的真正力量,要超越纸型文档以货架数字表示的简单功能。

在19世纪和20世纪,档案技术随着文件生成、再现和分发领域重复和交替的进展而发展,第一个漫长的革新是围绕着生成文本的方式而进行的。早在14世纪,在军火制造商 Remington 和儿子们于1874年在奥尔巴尼以西60英里制造 Sholes 和 Glidden 牌打字机前^[12],至少发明了100台书写机。现代档案技术史上第二个重要的进展应该是纸质文档的迅速分发和再现,标志是 Haloid 公司(即后来的 Xerox 公司)于1960年发明的复印机^[13]。到20世纪60年代中期,IBM公司带有磁带存储器的电动打字机,以及手动将无格式文本用于机器处理的文字编辑器的出现,带动了个人文档的组成和格式等方面采用所见即所得的文字处理软件的第三个进展^[14]。注意力迁移到两个前沿:一是将格式固定的内容在多种不依赖于平台的系统间分发;二是大容量文档的存储与检索以及之间的复杂关系。1990年, Tim Berners-Lee 在欧洲粒子物理实验室(European Laboratory for Particle Physics Particle Physics, CERN)编写了第一个网页浏览程序和一套简单的标注语言,即后来的 HTML(超级文本标志语言),以方便不同地方的科学家进行研究协作^[15]。这项发明实际上并不是很新,早在50年前, Vannevar Bush 在为大西洋月刊所写的文章中已做了预言,他所描述的“memex”机器与现在的 World Wide Web 和超级文本链接有着预见性的相似。到20世纪90年代中期,档案入库和分发领域的创新是建立在成熟的关系型数据库技术之上,将存储于服务器平台中的文档与数据库中相关的索引属性有效地链接起来^[17]。

上述的发展过程交替地扩展和缩小关注对象,从档案本身到多文档及其作者和使用者的间隔,发展的重点在文档生成以及文档的再现和分发之间周期性地来回变迁。进入21世纪,档案技术领域流行的趋势是将文档的生成、



再现和分发融合,只要业务允许,将采用简单的方式确定文档的传送、再次使用和机器处理。的确,越来越多的业务模式将要被迫适应操作这种“文档”的前景。在新药开发中需要立即获得决定性资料,需要控制开发费用,需要缩短研发时间以延长专利生命周期,对于管理和法规查询的快速反应需要检索和研究资料,这些只是制药工业需要适应的几个新的情况^[18]。

文档管理原则

传统的档案管理模式基于橱柜、文件夹和文件^[9],在第一个电子文档管理系统中将这种物理模型进行逻辑上的延伸,将文件置于虚拟的橱柜和文件夹中。

1. 档案室模型及其安全

文档的安全模型基于控制谁能阅读文档、谁可以生成或编辑文档、谁可以删除文档,在不同的级别赋予不同的权利。这可以用真实的图书馆或纸质档案室加以说明^[9]。首先,你必须持有适当的凭证进去浏览馆藏;其次,一旦你获准进入馆藏区,你的职务或部门所属关系将决定你能阅读何种档案;再次,假定你有权阅读某一档案,你也许只能阅读最终的文件,而不是草稿,只能在档案室,而不能复制;最后,如果你能在限定时间内将档案带离档案室,你也必须在登记册上签上你的名字。所有这些约束限制了你对馆藏的权利,目的是保证下一次查询时档案没有发生变化,而你也对此负有责任。

2. 输入-输出模型和质量控制

传统的文档管理依赖于一个十分简单的输入-输出模型,企业寻求管理存储文档(输入)的方法,使得检索(输出)简单明了。真正目的是文档的迅速检索,智能存储能达到这个目的。大多数企业不会为了速度而牺牲准确率,因而首先要注重所处理资料的安全、完整和真实,企业必须采取一定机制以控制和跟踪输入与输出过程,包括文本、检索、协作或工作流程。在无纸环境中,速度、智能存储、资料检索的准确性仍然特别重要,随着无纸环境容量和复杂程度的增加,符合这些要求越来越困难。

电子文档管理系统(EDMS)

1. 目的和目标

电子文档管理概念在传统的纸质信息管理和新型的信息化时代门槛之间提供了一座桥梁,从纸质到无纸的文档系统的转化,公认的目标是改进商务流程,通过挖掘无纸的众多优势,最终提高企业的业绩和账本底线^[18]。要实现这些目标,核心指标如下:

- 在个人的控制范围内管理纸质和电子文件的生成,以提高效率和有效性;

- 可能的情况下通过最优使用、重复使用和循环使用企业文档以提高生产率;

- 提高文档分类、索引和检索的一致性;
- 在必要的控制下提高文档在部门内、部门之间的共享;

- 保存结论性和责任性的文稿;
- 自动化的保留和处置程序进行档案的复审和清除。

对无纸系统提出这些目标^[19],也许有助于了解在特定的商业环境中实现无纸系统的功能要求。

2. 系统要求

在商业环境中实施任何的技术之前,有必要全面地规定系统的商业和功能要求。商业需求独立于技术,描述了必须执行的高层次的活动过程及系统必须满足的限制条件。功能要求更详细地概括低层次的必须执行的运算及对执行运算机制的限制。

2.1 结构要求:橱柜/文件夹结构

EDMS最显而易见的商业要求是使用户能容易地放置和取回存储在系统内的物品,这意味着文件应该放在有组织分层次的档案室中。药物文件必须能按其识别信息自动地存储在文件夹的适当位置,而不是通过浏览所有的层次手动放置,对于有数百个处于不同开发阶段的化合物的企业来说,整个层次是相当大的。文件可按关键词或关键档案属性(索引或元数据)进行放置。

与药物开发的整个周期(包括实施临床试验)有关的系统管理的文档,其档案结构可能与图1相似。

2.2 输入要求:生成和输入文件

EDMS真正的商业价值的实现程度,取决于在企业中不只是完成与档案相关的任务。为了完全实现这一目标,企业的无纸文档系统要在整个档案生命周期中发挥作用。除了存储现有的文件外,有适当的系统授权的用户必须能在电子文档管理系统内部新建电子文件。系统必须明确地支持商业上的文档格式,典型的包括字处理、电子数据表、图表和资料库文件。

企业EDMS必须方便地容纳不是在系统内部生成的文件,它必须能输入电子的或纸质的文件。从技术上讲,能在现代的电子文档管理系统内存储的文件是没有限制的,但应注意,某些类型的文档,如数据库,无法用不可变显示格式(如PDF)有意义地提供,通常经授权申请后以默认的只读文件形式浏览。

2.3 修改要求:版本控制和档案生命周期

以充分合理的方式跟踪变化的能力是实现有关效率、数据完整性和责任制度的企业目标的核心。为了实现对文件开发的整个生命周期的控制,具有适当授权的用户必须能够消除、修改和登入文件。

在纸质档案馆中,对于文件的真实性或正式性的怀疑

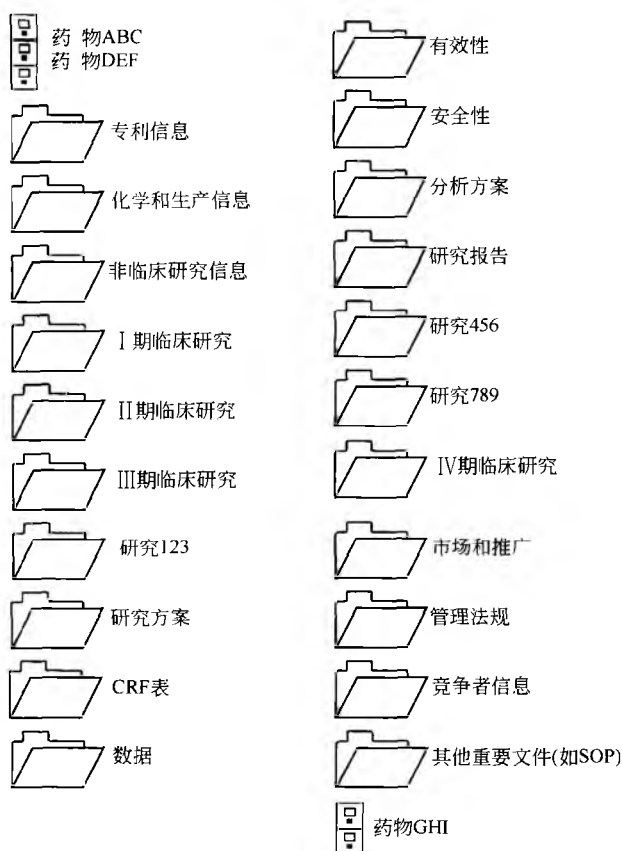


图1 档案结构示例

通常是用相关的政策和制度来回答的，这些政策和制度规定只有最终的和正式的文件才会保存。在 EDMS 环境中，文件草稿与最终的版本同时进行管理，有必要加以控制以确保默认检索文档的现行版本，只有在明确要求后才能检索以前的版本。这对于归档和协作以及工作流程至关重要。EDMS 必须施行不复制的原则，在文件的生命周期内必须有选择地授权以控制对文件的修改。系统应能区别文件的草稿、校阅稿、审定稿和最终版，按文件的生命力周期状态施行商业规则，以确定安全措施。例如，当文件被指定为最终版状态时，用户可以阅读，但无人能修改。EDMS 提供的控制在回答文件的正式状态或现行版本时应确保可信。

2.4 检索要求：属性和检索

在数字信息时代，想法和消息可以再加工和再使用，其可携带性和最终的实用性依赖于在浩瀚的二进制数序列的宇宙中发现特别的数据比特流的能力。随着企业 EDMS 中文件数量的增长，容纳文件的文档结构变宽和加深，从储藏室中检索任何特定的项目变得更困难。通过基于文件内容、属性或两者的检索能完成迅速和精确的检索。使用者必须能够将查询保存以供将来再次使用，并将查询结果储存于管理中心的专一的场所。一个简单的 FIND 命令必

须让使用者要么搜索文件的全部版本，要么局限于现行版本。系统必须有效，并保存分类值的控制目录和状态值的控制目录。

基于文件内容的检索是用字或短语等关键词进行的检索，另外，文件属性是有关文件的摘要信息，如用作者名、方案号、与文档有关的药名、文件标题、修改日期、业务种类、赞助业务部门、文件修改的里程碑、项目名称、版本状态、版本号等，通过这些将文件进行索引。文件的属性在系统中必须是唯一识别的，这些元数据保证了在大量的文档中进行智能检索。在文件归档时采集什么元数据主要依赖于业务对于检索文档的要求，尽管有些通用的元数据在各种设置中都适用。

作为公司审计员，设想我们面临着一个令人不快的但必要的工作：检查过去 5 年中某一指定部门执行认可的合同的情况，对于化合物 XYZ 进行特别的最后结果分析——EP 分析。我们只要简单地考虑在纸质档案文件中检索所有出现的术语，如“EP 分析”和“认可”的景象，来既直接又充分地欣赏电子文档管理的能力。即使我们能够将该部门所有的纸质合同实物地分开，仍然有着海量的工作要做，即确定其是否涉及特定的分析。对一个元数据索引满足了业务部门的检索需求的全文本索引的 EDMS 来说，这种对于文件类型为“合同”的检索是小菜一碟。

丰富的专业语言直接随着它所竞争的纵向市场的专业化而变化，能检索所有相关文件而不必指定相应术语的每一种变体的能力，在执行有效的和高效率的检索时至关重要。这种文档检索方法是远离简单的字符串匹配，是向挖掘数据的含意的方向改变的开端，制药工业是一个显著的例子，完全依赖于为了经济活力对资料与情报挖掘的能力。

最后，在进行特定的检索时，共同采用了归档层次、索引属性及综合了全文索引、同义词或适当标准来指定上下文，EDMS 系统能进行大多数有效的检索。

2.5 输出要求：阅读、打印和输出文档

具有适当的系统权限的用户必须能将文件以原来的形式输出到任何一个当地或远处的档案系统供其使用，文件必须采用标准的只读形式供阅读。即使用户没有原来的软件也应能阅读文件，用户还应能在 EDMS 内将打印的或输出的文件与原始档案进行核对，通过独特的系统产生原标志——水印进行比较。

水印不应影响文件中的任何消息，格式也必须标准化，文件装订的时水印也不应模糊。

一旦将一文件收载于 EDMS，可以很方便地在许多不同的地方发行，仍然坚持不复制的原则。通过企业的内部网、局域网和广域网可以直接进入整个机构的文件储藏室，而不必将资料库进行物理复制。企业规模的文档管理系统是可升级的，一个事例可以支持数千用户。而且即使基础文档体系不适合所有客户的要求，大多数 EDMS 程序包允许通过一种有时称为虚拟文件的设备进行文档的重分类。这样使得将文件存储一次，就可以不同的方法呈现不同的



用户。例如,临床小组和计量生物学小组均有他们自己的标准文献格式,每组都要求一份研究者的简历,系统可以生成两份结构不同的虚拟文件,每份为简历的单一副本。实际上现在市场上所有的 EDMS 系统都可以充当网络的安全的入口,能够通过普通的 HTML 超链接进入系统内存储的文档。

电子文档管理能够基于许可或访问控制表 (ACL) 进行文件的分发。若一文件可用,系统会自动通知用户,一旦某一文件的状态为更新到最新版或审定版,系统会自动发送消息给收文单位表上的成员,提示他们文件已经发表了。还可在电子邮件中附上 EDMS 中文件的指针,使查阅文件更方便。

有适当的系统权限的用户必须能阅读文件,通常 EDMS 中供阅读的文件是只读文件,要么是授权使用,要么是采用不可更改的文件形式如 TIFF (tagged image file format, 标记图像文件格式) 或 Adobe 的 PDF (portable document format, 可移植文档格式) 格式。由于灵活性和平台独立性,PDF 已经成为现代电子文档管理系统的存储标准^[5]。大多数系统会自动生成 PDF 文件,能按用户的阅读要求提供 PDF 转换。

2.6 工作流程要求:协作和电子认可

制药工业是一个合作的产业,EDMS 必须给用户提供了电子传输嵌入消息的文件给其他的用户审阅和批准。系统必须能够传输多种协作的文件类型,如 SAS 日志、目录、表格、图表、数据库和程序文件。用户间传送文件包含了常规的功能,如审阅、注解和编辑,而不需要通过办公室间传递多种纸质文件。另外,在标准的办公室电子邮件程序中集成了这样的常规功能,可以在 EDMS 环境中通知合作者某一项目可供审阅了。

完全电子化工作流程的核心,以及从工作场所消除纸的关键,是某种电子认可设备。电子认可有几种方式,每一种均意味着要替代亲笔签字。概括地说,电子签名与拥有者通过验证下述三项中的一项而联系起来:①拥有者知道什么;②拥有者有什么;③拥有者是谁。

2.7 加密和权力证书

随着创建、维护和储藏机构的重要业务文件的电子系统的发展,只以电子形式保存的文件数量的增长,电子身份识别也不得不发展。的确,随着职业部门内和部门之间流动性的增强,这些电子身份识别也要跨越多种结构。在这种情况下,当面临电子许可的安全性和有效性时,加密和数字证书是要考虑的最后一个问题。权力证明书 (CA) 为数字世界的办公护照。这些行业发布数字证明书,并确认持有者的身份和权力。担保一份可信的权力证书时,公钥基础设施 (public key infrastructure, PKI) 和数字证书是最值得信赖的。CA 将个人或机构的公钥和其他的识别信息嵌入每个数字证明书中,然后用密码“加盖”以防篡改封签,验证其中的数据完整性和用途^[20]。

签字人知道什么:这是最简单的管理方法,因为它依赖于将独一无二的 ID 和口令分配给企业的每个成员,在计算机网络广泛使用后这一操作已经很普遍了。

签字人有什么:使用智能卡或其他包含识别信息代码的物体发布许可。

签字人是什么:三个许可方法中最可靠的方法,依赖于一些计量生物学标识,人体物理的和不可复制的身份标志。这些标志包括指纹、视网膜脉管图案、签字风格 (如速度、压力和笔画顺序)^[20]。

在制药工业中实现电子认同时,遵照 FDA 关于电子记录和电子签名法规 (21CFR Part11) 极其重要。除了对维护电子记录的安全和完整的总体要求外,该法规对于使用电子签名还有特殊的要求。首先,签署的记录必须表明所有以下的消息:①签署者姓名的印刷体;②签字的日期与时间;③内容 (如校阅或者认可)。其次,法规要求对电子记录的签字必须与记录联在一起,不能删除、复制或转移到虚假的电子记录上。再次,法规要求在机构内个人的电子签名是唯一的,只有拥有者才能使用该电子签名。最后,也许是最重要的,21CFR Part11 要求通报电子签名用户,他们的电子签名使用时与传统的手工签字有相同的法律效果^[2]。关于电子记录和签字的详细法规在本章的后面加以说明。

2.8 安全性要求:保护公司资产

资料及其知识库是制药公司除了人以外的最重要的资产,公司的文档管理系统或者能保护这个资产,或者将其置于危险之中。资料的完整性和保证数据免于欺骗性的人为操纵是新法规控制电子记录管理系统的核心^[2]。技术上已经实现了在每一个级别安全地使用文件,就像纸质档案室的图解说明一样。这些级别包括从总体的到特定的存取权限,通过用户注册名 (用户安全性)、用户在团体内有所属部门 (团体保密),和文件状态加以定义。一个访问级别的权限可以直接赋予限制更高的级别。对于任何用户或用户群,权限分类包括无、浏览、阅读、编写、编辑、删除及全部。

企业网络安全:在最基本的级别上,使用电子档案室如同使用实体的档案室一样要进行监控。防火墙相当于建筑入口的保安。企业防火墙是位于企业的计算机网络,或内部网和任何外部网络之间的屏障。通常,防火墙过滤进入的数据,提供或管理进入所需场所的公众通路,只提供系统管理员明确许可的服务,记录通过防火墙的交通和活动,发现“小偷”时要启动警报^[21]。

数据库安全:使用 EDMS 时,访问取决于唯一的用户标识符和口令,此时,数据库安全作为门口的警卫,要求出示你的“徽章”才能获准进入。系统管理员保持有效的进入系统的 ID 和口令的注册更新,通常与人力资源部的现行目录链接起来^[9]。

文件夹安全:和档案馆模式情况一样,进入档案室并不授权你自由访问所有的馆藏。一个文件夹可能只有特殊

类别的用户才可访问。对于文件夹的用户授权典型的有无、浏览或阅读。创建文件夹的权力通常限于 EDMS 管理员。

文件安全：有时指定的一类用户可以访问文件夹中所有的内容，但也有时整个文件夹中有部分文件不能访问。如人力资源部员工可以访问包含所有员工的劳动待遇的文件，但不包括人力资源部员工。EDMS 必须对这些特别的文件进行安全设置，以保证人力资源部门员工不能观看。

版本安全：在纸质世界里，档案室保存的档案材料在某种意义上是最终的稿子，通过状态决定其安全级别。在电子文档管理环境中，文件按其性质在整个生命周期中均进行管理，包括草稿资料，因此除了允许或不允许翻阅最终版本外，电子世界里还要考虑草拟版本的安全。通常，只有作者、编辑和文件的审定者才能接触到定稿前的草稿。一旦文件进入最终状态，可以向更多的读者公布。而草拟版本，相反，仍然只能由作者接触，或锁定或从系统中删除。

2.9 灾难恢复

如果没有提及审核跟踪和灾难恢复，文档管理环境的任何安全措施都是有疏忽的。

系统必须保存文件生成、修改或删除的日志，自动日志包括受影响的文件情况、发生事件的时间、引起事件的用户等^[2]。

灾祸包括完全意外的灾难，从内外部的怠工到极端的自然力量，如火、龙卷风和地震等，对公司的实物资产造成实质性的破坏。每个事件对企业赢利能力和生存能力造成严重的危害。因此，要仔细考虑灾害恢复计划，管理系统要完全支持，这是非常必要的。

2.10 保留需求：存储和删除

要牢记 EDMS 在整个文件的生命周期中都要能管理文件，系统应该自动生成保留一览表。系统应该基于按商业规则进行的文件分类计算文件有效期。系统然后应该按计划通知文件拥有者，通常按预先规定的时间间隔在实际销毁前通知，以便最后检查是否为了商业需要而延长保留时间。可以在系统的自动检查以及保留或删除功能中引入法规和法定要求的商业规则。存储媒体的更广泛的讨论参见 Pollnow 的文章^[22]。

制药工业中文件的按期退役尤其重要，这个领域的公司通常会受到管理当局的审计，或受到起诉。因此保留草稿文件和其他的老文件，经常不必要地增加公司的负担。尽管是集中管理，但保留程序仍要理想地设计一个机制，在文件销毁、打包存放或转移前通知文件拥有者，因为文件拥有者可能会因强制性的商业或法规的原因延迟销毁文件^[23,24]。EDMS 允许企业将保留程序的所有方面进行自动化或合理化设计，包括编制时间表、通知和退役。

3. EDMS 工具箱

电子文档管理系统是一个整合的系统，包括设计工具、

数据采集工具、短信系统、数据库存储、入口，以及内网和互联网络的分布和转移等。没有一个魔术子弹或者单系统能为企业的文件或知识管理需求提供解决方案。由于每日总会有新的产品出现，技术上最好的投资回收必须建立在开放式体系结构原则、最好的增值产品和可伸缩性基础上。设计、构建和持续地改进公司的“数字神经系统”^[18]是在无纸环境中做生意的花费之一，在下一节会粗略介绍一些重要的进展，这些进展无疑会持续改进和改造这个复杂的、不固定的公司“神经系统”。

出现的范例

从纸环境到早期的电子环境的转换是直接的和直观的，然而新的计算模型和技术，却令人怀疑这种复杂的情报收集、访问和保留模式的有效性。在现代技术环境中，表格、文件和资料不是固定不变的，而是动态的和交互式的。机器对机器的交流和协作与直接的人与人的互动一样频繁。

看起来在快速发展的计算和通信世界^[8,25]，媒介的与信息一样重要。现在能做到将资料与情报与任何的文件结构和技术平台分离开。文档管理系统应用技术锁定文件、控制版本、保证文件对象的安全，单元管理系统在粒度更小的级别对文件碎片、文件块应用同样的特性。换句话说，单元管理环境不是核对整个文件进行编辑，而是核对单个章节、段落或表格。就像 EDMS 中的基本文件对象可以组合成多种多样的虚拟文件，在单个管理系统中，文件块形成基本元素，也能组合成整个文档。单元管理是管理搜索公共的技术文件^[20]后面的精确观念。

既能生成文件，又能将文件内容重新指定用途和重新分发的技术称为可扩充标注语言（extensible markup language, XML）^[27]。在无纸文献系统中，XML 标志着从整个文档的管理向组件或内容管理的转变。XML 是描述文件内容的语言的元语言，它是标准通用标注语言（standard generalized markup language, SGML）的子集，见 1986 年制定的 ISO 标准 8879。SGML 设计用来生成独立于任何指定的硬件或软件的便携式文件。

超级文本标志语言（HTML）也是 SGML 的子集，开发用于在网络中传送超文本文件，并指定文件在网络浏览器中如何显示。但 HTML 并不描述文件有信息，也不描述其组织方式。XML 正好填补这个空隙，通过使用标签和属性以扩充、验证和明确组织文件的内容。

不是将信息系统中文件视为供人阅读的被动对象，SGML/XML 规范将其视为主动的交流，可以通过计算机分析和操控。同样，它们是能被计算机使用的数据结构，而不是松散的文字块，只供能理解基础语法的人阅读。XML 描述文件内容和组织的能力，使其成为人类以及机器交流的理想语言。通过将信息以一定形式或标记进行编码，人类和计算机均能消化，XML 注定要成为网络中真正的混合语，其中，人和硅是创始者、经纪人和交易处理机。为实现真正的无缝交流，XML 重新考虑了文件本身的真正

本质。

使用 XML 标记结构数据时,为了应用预先假定存在一套规则或语法。这样的语法嵌入于文件类型定义 (document type definition, DTD) 或纲要中,两者均由 XML 作者定义。DTD 为一组标记语法规则,它制定什么标记可以用于文件、它们有什么属性,以及它们是否能嵌套在其他的标记内部。通常,DTD 与给定的 XML 文件分开维护,虽然它也可以是文件的一部分。不像 HTML 有单一 DTD,XML 支持与信息结构方式同样多的用户定义的 DTD,这就是扩展性。也有危险,DTD 和 XML 也只是和用于实现这种技术的公认标准一样有用。制药工业在为其重要文件开发标准 XML 标记时,获得了长足的发展,可以建立和维持广泛的公司间合作及与 FDA 协作。如果这个企业没能引导真正的合作,它的获益要远远少得多,只留下独特的和特殊的 DTD 及孤立的 XML,在转移和维护方面要有很大的费用。

纲要是 XML 更新的发展,类似于 DTD,概要为建立文件提供规则,指明什么标记可以用、其属性是什么,以及相互之间是如何相关的。与 DTD 不同之处在于:纲要还有更多的特性,它可定义数据类型。例如,DTD 的一个标签 DOSE,其内容可以是数字也可以是字符串,而纲要则能保证输入的值是数字。对于制药工业,这是一个有明显吸引力的特色,特别是在数据库或其他使用严格定义的数据类型的程序间进行信息交换时更是如此。

可是在写本章时,仍然不清楚是否纲要将取代 DTD 成为 XML 文件的基本模型。

XML 组织文件内容,但将显示和格式化交于其他工具,现在主要的工具是可扩充格式语言 (extensible stylesheet language, XSL),XSL 包含两部分:①转换 XML 文件的语言;②指定格式的 XML 文件。XSL 允许用户处理 XML 文件并动态地赋予它多种形式,目前技术支持 HTML、ASCII 文本、PDF、无线标志语言 (wireless markup language, WML) 和 XML 本身。

XSL 利用嵌入 XML 文件内部的信息以灵活的方式展示其组件,因此,XSL 并不仅仅对 XML 资料应用样式,而是评价、重新整理和重新集合它。事实上,XSL 对于 XML 文件允许多重传送,在 XML 源中出现一次的信息在同样的展示中能以不同的形式出现多次。XSL 提供我们不仅是观看 XML 资料的再现,它使得 XML 能实现其作为灵活源信息的潜力,生成一次,修改和展示无数次。应用这项技术准备资料,并向多个管理当局提交是显而易见的。

传统的纸质文档管理模式关注分散的文件、档案柜和签字的责任性。撇开在任何环境中均可进行欺骗的可能性,档案管理员负责统一的索引方案,通过文件上的签字确定资料拥有者,他保管的档案柜中的纸痕迹很清楚是可以追踪的。相反,计算机网络痕迹通过应用于资料和系统级别的有着多重签字或者访问权限的虚拟档案柜运转,该虚拟档案柜处于多重所有权、受保管和索引纲要状态。此外还有复杂的多层结构,以支持信息的交换和交流^[28]。所有这些元素是文件,媒体再也不能和消息分开了。

管理环境:法规对于传统的和新出现的模式的影响

制药工业无纸文献编制系统的开发与管理的开发是紧密相连的。企业部门和管理者均承认只有转向电子记录保存而无其他替代的方式。制药工业中最重要的文档记录部门无疑是制造环节,早在 1983 年,FDA 就发布了关于计算机化系统用于药品制造业的检查指南^[31]。在这种环境中,如果没有确切的证据支持所声称的事件的一致性和完整性,没有文档资料、消息、事项、动作、标准申请、历史上的经历、审计经历,或人员经历和培训,那么事件、动作、协作或资料本身就是不存在的。FDA 官员经常重复地说,如果没有文件记录,就没发生过。FDA 将第 11 条关于电子记录和签字的最终法规所规定的必要条件和标准移植到 GMP 条例中^[32]。该机构承认最本质的条例是书写在纸上而不期望使用任何技术^[2] (引文注释 XVI. A, p. 13462)。

制药工业的制造环节与其他环节,特别的临床研究环节的根本区别,使得遵守和采用资料和文件的电子管理标准有更多的特殊困难。在制造部门,工序的文件编制和结果主要局限于一个场所或者工厂之中,有着单一的连贯的企业文化,是相同的,各个部门是相当无缝地整合在一起的。另一个极端是在制药工业的临床研究环节中,工序的文件编制结果分散在多个场所,如研究部门、CRO 机构、实验室和主办者办公室。有着多种企业文化,每一种均不相同,如研究机构、咨询服务、数据管理小组、市场部和财务部门。这些多样的文化和部门并没有很好地通过一张纸或任何其他的技术平台整合。

1995~2000 年,影响制药工业的关键立法有四个:

(1) 1997 年 8 月 20 日生效的 FDA 电子记录和电子签名法案。这是一个许可法规,允许任何 FDA 管理的工业运用无纸文献编制系统,该系统将会与纸质的记录和管理系统有着同等的法律地位。

(2) 1997 年 3 月和 7 月生效的 ICH (International Conference on Harmonization of Requirements for Registration Pharmaceuticals for Human Use, 人用药品注册技术规定国际协调会议) 推荐的法规资料传送的电子标准。这个成员国协议确定了开放的非专有国际标准,即供企业和法规当局传送数据和文件的电子通信标准。

(3) 1998 年 10 月 21 日生效的政府消除纸质公文法案 (Title XVII Pub. L. 105~277)。这是一个美国法律,要求联邦机构准备到 2003 年接受要求保存、公开或向美国政府提交资料的个人的电子信息。

(4) 2000 年 10 月 1 日生效的全球和国家贸易中的电子签名法案。这个美国法律再一次赋予商业贸易中的电子签名和电子签名的文件享有与纸质文件上的手签名同等的法律地位。

后面的两个法律,尽管只是美国联邦政府法规,由于美国经济在世界市场上的重要性,将会影响所有的电子贸易。美国企业将要寻找该法规提供的竞争优势。





制定规章的当局充分认知到新的、快速发展的计算机环境对其职责造成的复杂性。FDA 和 ICH 均希望以基于非专有的标准和通用工具的行业法规和指南避免被迅速地淘汰,如 Adobe Acrobat 的免费的便携式文档格式编码和阅读器程序。ICH ESTRI 的网关协议是试图定义一个不依赖于平台的环境所迈的第一步。

1. 电子记录和电子签名的最终规则

FDA 的电子记录和电子签名的最终规则(最终规则第 11 条)要求进行特殊的讨论,因为它是迄今为止在其管理的行业关于应用计算机技术最广泛的规则。规则本身只有两页,可以证明有关制药工业的最重要的部分是引言,它包含 34 页的讨论,关于 FDA 为何和怎样决定这个规则的。打算制定的规定及最终制定的规定两者的引言详述了现在的管理当局对于无纸文献编制系统的思考和关注^[34]。

1.1 范围

开始时披露打算制定的规定为电子签名规则,到联邦注册最终规则(62FR 13430, 1997 年 3 月 20 日)出版时^[2],标题扩展成“电子记录和电子签名”。对于可能限制规则的范围为签字权力和表明观点,或只是需要签字的记录, FDA 拒绝做出说明。该机构的基本原则是电子签名的可靠性和真实性在很大程度上依赖于电子记录的可靠性,以及电子记录必须是可靠的、真实的,并与 FDA “保护公众健康,不管是否有签字”的要求相符合^[2](引言注释 26, p. 13438)。因此,按该机构的意见,保存电子记录本身需要规则。到 1997 年 3 月,管理当局充分认识到新的计算机和网络技术,以及互联网和无线技术引发的通信爆炸。

第 11 条定义档案管理为“生成、签字、修改、存储、存取和检索”记录,以及在此过程中使用的软件和硬件平台。这个规则适用于 FDA 的“断言规则”所要求的所有文件。当局引用这一规则的有联邦食品、药品和化妆品法案(21U.S.C. 321 ~ 393)的 201 ~ 903 节,公众保健法(42U.S.C. 262)的 351 节。例如,21CFR 820.70 要求卫生器材的质量系统中工艺和生产控制的文件编制,这是一个断言规则。如果有任何文件通过电子方式生成、签字、修改、存储、存取或检索,第 11 条就适用于该文件以及使用的硬件和软件。

1.2 适用性

使用第 11 条时有一条注意事项,它是一个容许规则。行业可以选择性遵守。然而,如果公司现在使用电子系统生成、签字、存储、存取或检索档案,那么法律假定他们已经选择遵守条例和遵照标准。因此,该公司成为 FDA 强制实施食品和药品条例的对象。如果该公司选择不遵守规则,它就必须恢复到纸质系统。按照最终规则,没有一个电子系统可以例外。持续依赖于目前的电子系统进行任何一个电子记录管理活动,为了安全和可控,必须遵守第 11 条的要求^[2](引言注释 XVI, C. 1, p. 13463)。

1.3 重要问题

如果要实行合适且和合理的政策和程序,行业了解 FDA 建立这些条例的基本原理是很重要的。只有在彻底了解了最终规则的引言讨论部分后才能做出行业对规则的解释^[34]。FDA 对保护公众健康的关心转化为最终的规定说明四个主要问题:资料 and 资料源(审核跟踪)的鉴别和认证、系统可靠性和安全性、签字责任(拒绝和连接),法律执行(权力、检查和履行)。

资料 and 资料源(审核跟踪)的鉴别和认证:在保护公众健康的能力和认定个人和公司责任方面, FDA 最关心的是检验记录完整性的能力,以及追踪生成和修改资料的责任。

必须有一个系统产生的附有时时间的审核跟踪,应用于任何对记录的存取、修改或删除,以及审核跟踪本身不依赖于系统的操作者而生成跟踪结果。审核跟踪能发现伪造的文件和签字,在伪造事件发生时提供跟踪证据^[2](引言说明 72~74)。

系统可靠性和安全性: FDA 意识到故意欺骗是很难阻止的^[2](引言注释 7, p. 13433)。因此,该机构分别在操作、网络和器材三个级别分别规定了系统控制要求,以确保数据库资料是以不歪曲资料、不隐藏相互矛盾或不利的资料为前提产生的,资料库本身也没有为扭曲事实或篡改记录而修改。

对于封闭的和开放的系统的控制要求不同。是否使用公共电话线和开放系统间没有直接关系。系统标准是封闭还是开放取决于信息拥有者对于资料或文件的访问权的建立方式和控制方式。如果对于档案或者资料系统的访问受到负责系统中档案或者资料内容的人的控制时,该系统为封闭式的;如果不受其他的控制,系统为开放式的。例如,通过公用电话拨号检索是封闭式的,存取的档案处于负责其内容的人的控制之一;将档案存储于第三方的系统中是开放式的,因为对于档案本身的获取是由第三方控制的。最终法规的 11.10 和 11.30 节分别列出了建立封闭和开放的系统所需的控制措施。

必须使用独特的计量生物学或数字识别技术保护对数据的访问,计量生物学技术的例子包括语音和指纹识别。若不采用生物计量或数字签名技术,必须采用两个不同的识别码,如网络用户 ID 和口令。所有的访问权和系统提供的识别码必须定期由资料 and 文件拥有者审查、更新和修改,所有的个人的识别码(如口令)应由用户定期修改,以确保未经授权的人不能访问资料和档案。开放系统还要求对资料和档案加密,以防止不正当的获取。

签字责任(拒绝和连接):签字可以表示不同的意向和责任,电子签名必须收集这些元数据。电子签名可以用计量生物学或数字技术,或联用这两种技术来实现。为确保电子签名可以确定无疑地与拥有者有关,不能被拒绝,签名有明确的意向,并理解了签字法案,第 11 条提出了最低标准和推荐了通用的技术^[35]。不管最终采用何种签字技术,必须使 FDA 认定个人要承诺他们的电子签名^[2](引言



注释 19, p. 13456)。

事实上, 当有人建议 FDA 也要认定企业和个人一样负有责任时, 该机构拒绝了, 因为企业并没有在文件上签字, 而是个人签的^[2] (引言注释 90, p. 13450)^[23]。

法律执行 (权力、检查和履行): 第 11 条引用完整的联邦食品、药品和化妆品法案作为该法规的依据和执法范围, FDA 需要“可实施的”的基本标准^[2] (引言注释 2, p. 13432), 并打算针对负有记录或签字的真实性和可靠性的电子记录和签名系统, 检查其所有的组件^[2] (引言注释 33, p. 13489)。该机构保留检查的权力, 如果有必要, 甚至是敏感的安全防范系统也要检查, 以保证该法案和相关的章程得以执行^[2] (引言注释 32, p. 13439)。补充指南会提供标准的补充细节, 据此 FDA 检查员做出判断^[7]。根据目前的规定执行情况, FDA 可能会考虑更多的立法或修改刑法^[2] (引言注释 90 和 124, p. 13450 和 p. 13458)。第一份 FDA 关于遵守第 11 条的 483 检查报告出现在 1999 年, Paul Motisse 广泛地考察了 FDA 第 11 条的体系结构, 同年转到检查部门。随着该机构对于新技术的经验和信心的提高, 有关第 11 条的执法活动会显著增强。

2. 经济影响

FDA 宣称电子记录管理能减少审查时间和相关的企业成本, 如空间和快速的信息存取, 但遵守该规定会抵消掉减少的费用^[2] (引言注释 XVI, C. 1, p. 13463)。当行业和管理当局进入了美好的无纸世界, 这一点还要加以证实。

现在讨论关于纸和无纸文档系统的相对优点的主流观点是很有利的, 关于电子系统的全部优越性的宣称也许是夸大了, 并与使用环境密切相关。其他方面或拥有与表面显示的一样多的优点。表 1 总结了两种文档管理模式的优缺点。

尽管纸质模式管理企业文档时, 不能满足复杂的文档管理要求, 无纸模式也不是没有不足, 让我们更详细地考虑一些因素。

表 1 纸质和电子文档管理的优缺点

文档类型	优点	缺点
纸质	熟悉	费用高
	经久	检索效率低
	透明的安全模式	占用空间
		妨碍信息资产的杠杆作用
数字		影响环境
		着重于独立的储藏功能
	空间利用率高	储存介质耐久性差
	检索效率高	技术标准一直在变
	促进信息资产的杠杆作用	IT 初期投资大

① 1in=2.54cm。

② 1ft=25.4cm。

续表

文档类型	优点	缺点
	节约纸张	IT 管理费用高
	集成主动的文件管理和储藏功能	影响环境
	自动审核管理	

2.1 费用

据说纸质系统费用高, 每张纸约 0.10 美元, 一个 2000 名雇员的机构每年保守的估计印刷和归档 500 万~1000 万页, 将要花费 50 万~100 万美元^[19]。算上设备购置、保养及硬件和软件系统的运转费用, 数字文档系统会更花费更少吗? 答案依赖于系统数字化的程度。在一个部分数字化的系统中, 有些文件要用纸印刷出来, 扫描输入电子文档系统, 完成一篇文件的索引和扫描的平均费用是每页 0.50 美元, 范围是每页 0.20~1.20 美元。很难计算电子生成文件和归档的数字文档系统的费用效率, 总的费用要包括电子系统初期的投资和维持费用。制药工业与其他的电子贸易一样, 需要找到一个新的衡量每页费用的方式, 用来计算在无纸环境中进行商务活动的费用^[18]。

2.2 效率

人们越来越认为纸质系统效率低下, 与用于保存纸质文档的档案室方案相比, 对于电子检索巨大的和分散放置的档案室的能力的真正效率, 我们很难有疑义。在纸质环境中, 仅仅检索文件, 每人每周估计要花费 4~7 小时^[19]。还不包括从办公室到档案室, 走在档案馆走廊上, 浏览书架和文件夹, 最后翻阅文件本身找到相关的段落所花的时间。在一个 2000 人的机构里, 按每年 250 个工作日计, 整个机构每年要花费 5 万~8.75 万人工。

相反, 在电子环境中搜索与检索, 据说能节省 10%~20% 的总的工作量, 不仅是检索文件的工作量。一年中, 电子系统能为公司节省 5 万~10 万个人工, 基本上所有的这些时间都花在了纸质系统搜索, 甚至更多^[19]。如果网络停机时间相当于雇员停工期, 比较两种搜索与检索模式显得很荒谬^[36]。

2.3 空间消耗

如果企业每个职员平均每年制作约 500 份文件, 从外部收到 200~300 份, 平均每份有 5~10 页纸, 2000 名雇员产生约 100 万份文件, 有 500 万~1000 万页^[19]。加上外来的文件, 该企业又要对付额外的 200 万~600 万页。再运用乘法, 一令纸 2in^① 厚, 该企业要找到空间容纳 2333~5333 叠 8.5in×11in 的纸, 体积为 1515~3463ft³^②。用大家熟悉的用语, 上述体积最多要占用 35ft×100ft×100ft 的房间。



这还不包括文件夹、书架和过道空间等供合理地存储和浏览文件所占的空间,而且这仅仅是一年中编制的文件的体积,为了保存这些文件,即使像城市街区一样宽的建筑物的地板也会很快地被占用。

1000 万页大约需要 500GB 的磁盘存储器空间,如果按最低要求计算,十年的文件占用的服务器和磁盘驱动器也许不超过面积为 35ft×10ft 的房间。现在市面上 30GB 字节硬盘驱动器的标准尺寸是 2.75in×4in,高度小于半英寸,简单地讲,200 个这样的驱动器,堆叠在一起,不到 9ft 高,体积只有 0.5ft³。即使加上所需的服务器设备、监视器等,企业文件的电子存储器所节省的空间是相当可观的。然而,在数字世界里,大型和小型企业的预算表中均把数字化工作场所的带宽成本作为一项主要的项目。

2.4 环境影响

以上的比较说明高技术的数字方案一定是要绿色得多,然而,实际上无纸文档系统环境友好程度一样。通常,高技术企业污染较大。芯片制造过程中使用了许许多多的化学品,如酸、氰化物、四氯化硅等,许多物质单独就有毒或致癌,混合在一起时也许毒性或致癌性更强^[39~42]。制造业还浪费数量惊人的水,污染空气和水^[43]。摩尔定律认为计算机技术的能力,以小型化和晶体管及微芯片的数据密度衡量,每 18 个月翻一番,事实上导致了报废的机器与元件垃圾成堆^[44]。考虑到运行电子文档管理所需的电力,原来认为环境优势是显而易见的,实际上并不清晰。

目前的观点坚持无纸文档系统比纸系统对环境更无害。如果一个企业实现文件的产生、存储和检索电子化,可以想象,它就保存了与用纸数量相当的树木。在一个 2000 人的机构中,产生 1000 万份文件,每年相当于消耗 850 棵树^[19]。1975 年,一个典型的办公室每人消耗 100lb 的纸,在新兴的无纸化办公室,则超过 200lb^[1]。人们或许说,造纸企业就排出二氧化硫、树脂酸而言,造成更可怕的损失^[38]。

2.5 存储和持久性

考虑到最基本的安全问题时,如文件的持久性,人们很易于假定数字化信息有着严密的控制、坚固的结构和本质上的灵活性,必须对存储的文件资产提供更长期的保护。因而,往往会低估纸作为存储介质的持久性,而高估数字媒体的持久性,以及高估单一技术平台阅读数字媒体格式的能力和优势^[45~48]。

以上所述对于条例所作的预期经济影响有着直接的作用,该条例规范了制药工业电子记录保存系统。事实上,制药工业一旦迈入第 11 条管辖的电子记录管理之路,就要面临复杂的、高费用的开发和实施工程。制药工业投资回报的关键是跨越多个业务部门整合和实施技术战略规划的能力^[49,50]。

结语

数字手段提供了对原来经历的瞬间的分布式存取,在

无纸世界里,用户搜索资料和文件的过程可以是移动的、无线的或携带式的^[37]。文件已变成嵌入在不可分离的多种分层结构中的资料^[28]。科技和经济的力量从本质上重新定义了文档格式和用途。目标是越来越多的保存或再现直接交流、及时发送和实时更新。

除了文本外,文件对象还包括资料库、电子数据表、图表、图像、影像、声音和网址。过去的文件只成为文档的一小部分,如审核跟踪和元数据等。对于直接经验的文件编制可以立即供第三方参考。文件编制现在是动态的交互式的,而不是静态的影像纸。

制药工业是由传统技术驱动的,然而现有的技术使得研究开发、产品制造和处方药的推广在完全无纸的环境中进行。几年前波音公司的行政主管给航天工业扔下了一个铁手套,他询问如果不用纸来设计和建造一架飞机,会发生什么,他成功了。1999 年比尔·盖茨展示了进行电子贸易的商业实例^[18]。两者均在幻想了解信息新技术可能发生的事,并将其变成所处企业的竞争优势。

在临床研究领域,如 CRF 表,将成为复杂的、多维过程的数据收集,在线交互式地提供了患者的经历和资料。新技术如声音识别、数字医学显像、靶向药物发现技术、计算机设计和性能的变革^[8,25]及基因组计划^[51,52],给制药工业和管理当局重新定义怎样收集和管理特定项目的数据,将患者的经历用有意义的方式记录。上述技术,特别是能导致新发现、新基因定位和遗传信息的重复使用的技术,将重新定义患者知情同意权的执行和监测。试验方案本身变成一套“编辑检查”系统,访问权、系统管理规则和元数据组织结构。结构控制数据的在线收集、验证和分析。

制药工业应该怎样在新药的开发和市场方面应用这些可能发生的事?例如,完全数字化的临床研究,将革新制药工业关于文件、资料和管理审核的观念,对于制造业运用“波音”的挑战也并不是没有可能的。在制药工业的所有领域,基于信息和交互通信的市场,对于电子商务有着无数的模式和经验。在接下来的 5 年内,制药工业需要向传统的药品文件编制思想发起挑战,彻底探索放弃传统的纸质模式改为完全的数字环境的可能性和问题^[49,53]。

管理机构怎样适应这种新环境,并实现其保护公众健康卫生的法律要求?管理者在关于电子记录的最终规则^[2]和 ICH ESTRI 协议中开始应对一些问题^[5]。这些立法仅仅是有关法律、社会准则和监督技术的大量的和复杂的冰山一角。传统的文件编制将成为过去,取而代之的是复杂的、集成的数据收集和处置系统,能够与直接研究经历几乎同时进行动态的、实时的归档、分析、报告研究和发现结果。在制药工业领域,管理者和消费公众已经进入了一个崭新的合作世界。

技术名词词汇

完整的技术名词和目录见 <http://www.webopedia.com>。

参考文献

1. Brown, J. S.; Duguid, P. The Social Life of Information;

- Harvard Business School Press; Boston, 2000.
2. 21 CFR Part 11; Electronic Records; Electronic Signatures; Final Rule, Food and Drug Administration, 62 FR 13429, March 20, 1997.
 3. Government Paperwork Elimination Act, Pub. L. 105—277, Office of Management and Budget, Executive Office of the President, Proposed Implementation (64 FR 10895, March 5, 1999).
 4. Electronic Signatures in Global and National Commerce Act, Pub. L. 106—229, June 30, 2000.
 5. Electronic Standards for the Transfer of Regulatory Information (ESTRI), International Conference on Harmonization. M2 Recommendations, March 1997 (1.1—5.1) and July 1997 (5.2—5.3).
 6. Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients, International Conference on Harmonization, July 19, 2000; Draft Consensus Guideline.
 7. Guidance for Industry; Computerized Systems Used in Clinical Trials, Food and Drug Administration, April 1999.
 8. Mann, C. C.; Rotman, D.; Waldrop, M. M.; Garfinkel, S. L.; Regalado, A. Beyond Silicon: The future of computing. *Technol. Rev.* 2000, 103 (3), 42—84.
 9. Sutton, M. J. D. Chapter 8: Developing the Physical Model. *Document Management for the Enterprise: Principles, Techniques, and Applications*; John Wiley & Sons; New York, 1996; 223—244.
 10. Harvey, D. *The Condition of Postmodernity: An Enquiry into the Origins of Cultural Change*; Blackwell: Cambridge, 1989.
 11. Carlston, D. Storing Knowledge; www.longnow.com (accessed Oct 2000) Time & Bits.
 12. Rehr, D. The First Typewriter; dcrehr@earthlink.net (accessed Oct 2000).
 13. Carlson, C. F. The Photocopier; www.mit.edu (accessed Oct 2000).
 14. Word Processing; Information Processing; www.britannica.com (accessed Oct 2000) Encyclopaedia Britannica.
 15. Connolly, D. A Little. History of the World Wide Web; www.w3.org (accessed Nov 2000), 1945—1995.
 16. Bush, V. As We May Think. *Atlantic Monthly* 1945, 176, 101—108.
 17. Sutton, M. J. D. Chapter 1: The Transition to Enterprise Document Management. *Document Management for the Enterprise: Principles, Techniques, and Applications*; John Wiley & Sons; New York, 1996; 1—22.
 18. Gates, B. *Business @ The Speed of Thought, Using a Digital Nervous System*; Warner Books; New York, 1999.
 19. Sutton, M. J. D. Chapter 3: Planning for Enterprise Document Engineering. *Document Management for the Enterprise: Principles, Techniques, and Applications*; John Wiley & Sons; New York, 1996; 53—92.
 20. Yakal, K. Sign on the Digital Line. *PC Magazine*; Sept 19, 2000; 32—36.
 21. Chapman, D. B.; Zwicky, E. D. *Building Internet Firewalls*; O'Reilly and Associates, Inc.; New York, 1995.
 22. Pollnow, R. A. Alphabet Soup, Acronyms Everywhere—Media Options in Data Storage; Sept/Oct 2000; 44—47.
 23. Information Requirements Clearinghouse. Legal Responsibility for Records in a Corporation; http://www.irch.com/irch_article2.htm (accessed Sept 2000).
 24. Information Requirements Clearinghouse. Legal Requirements for Filing Systems and Indexes; http://www.irch.com/irch_article2.htm (accessed Sept 2000).
 25. Williams, S. Computing After Silicon. *Technology Review* 2000, 102 (5), 92—96.
 26. Organization of the Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, International Conference on Harmonization, July, Draft Consensus Guideline.
 27. Bosak, J.; Bray, T. XML and The Second-Generation WEB; www.sciam.com (accessed Sept 2000); .
 28. Horak, R.; Miller, M. A. Chapter 7: Fundamentals of Data Communications. *Communications Systems & Networks: Voice, Data, and Broadband Technologies*; M&Tbooks; Division of MIS; Press, Inc.; Subsidiary of Henry Holt and Company, Inc.; New York, 1997; 155—184.
 29. PhARMA (Pharmaceutical Manufacturers' Association) Position Paper on 21CFR Part 11, Docket No. 92N-0251Nov 30, 1999.
 30. Raymond, R.; Galle, S.; Collom, W. Regulatory Submissions; From CANDA/CAPLA to 2002 and beyond. *Drug Information Journal* 2000, 34 (3), 761—774.
 31. Guide to Inspection of Computerized Systems Used in Drug Processing, U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration National Center for Drug and Biologics and Executive Director of Regional Operations, Feb 1983.
 32. Annual Report for 1999; Food and Drug Administration, Office of Compliance.
 33. Hoff, S. The Regulatory Environment for the New Millennium. *Drug Information Journal* 2000, 34 (3), 659—672.
 34. Woodrum, P. 21 CFR 11—more than meets the eye. *Applied Clinical Trials* June 2000, 86—94.





35. Bleicher, P. Sign Here, Please, Mr. Bondh. *Applied Clinical Trials* August, 2000, 28—31.
36. Brin, S.; Page, L. The Anatomy of a Large-Scale Hypertextual WEB Search Engine; <http://www7.scu.edu.au/programme/fullpapers/1921/com1921.htm> (accessed Sept 2000).
37. Gingrande, A. Wireless Applications For a Brave New World; Sept/Oct 2000; 66.
38. <http://www.greenpeace.org/toxics/reports/gopher-reports/papdam.txt> (accessed Sept 2000).
39. Ayers, J. Controlling the Dangers of High-Tech Pollution. *EPA Journal* 1984, 10, 14—15.
40. Hayes, D. Behind the Silicon Curtain: The Seductions of Work in a Lonely Era; Black Rose Books; London, 1989.
41. Miller, M. W. Findings of Toxin Leakage in Silicon Valley Hurt Chip Makers' Reputation for Safety. *Wall Street Journal* Aug 29, 1984.
42. Seigel, L.; Markoff, J. The High Cost of High Tech: The Dark Side of the Chip; Harper & Row; New York, 1985.
43. Bills, B. High Tech Toxins: Is the Computer Industry as Clean as it Seems; www.canada.cnet.com (accessed Oct 2000).
44. Yang, D. J. On Moore's Law and Fishing; Gordon Moore Speaks Out; www.usnews.com (accessed Nov 2000).
45. Rothenberg, J. Ensuring the Longevity of Digital Documents; www.sciam.com (accessed Sept 2000).
46. Izarek, S. Archiving Today's Digital Culture; www.foxnews.com (accessed Oct 2000).
47. Lesk, M. Going Digital: Electronic Libraries will Make Today's Internet Pale by Comparison. But building them will not be easy. *Scientific American*; www.sciam.com (accessed Sept 2000).
48. Brand, S. Written on the Wind. *Civilization Magazine*; www.civmag.com (accessed Oct 2000).
49. Moore, G. A Balanced Buy; www.Darwinmag.com (accessed Nov 2000).
50. Heck, M. Document Management Fuels e-Business; www.infoworld.com (accessed Sept 2000).
51. Regalado, A. mining the Genome Project. *Technology Review* 2000, 102 (5), 57—63.
52. Philipkoski, K. Genome Map Heralds Cheap Drugs; www.wired.com (accessed Sept 2000).
53. Buderer, R. The Corporate Logic. *Technology Review* 2000, 103 (3), 88—90.

(王 浩 高 凡 译)



吸收促进剂

Jean Paul Remon

Ghent University, Ghent, Belgium

引言

关于吸收促进剂的使用已有大量的文献报道。本章综述了用于局部、透皮和黏膜给药的最重要的吸收促进剂。

局部和透皮

人们普遍认为大多数局部用药的生物利用度很低,已尝试过用各种不同的方法增加其生物利用度,其中方法之一是应用吸收促进剂。多年以来,研究者对新的化学吸收促进剂充满了极大的兴趣。吸收促进剂应具有药理学惰性、无毒、起效快、作用可逆,在化学和物理上能够同处方中其他的化合物相容,也能用于化妆品的处方^[1]。当然,不是所有的吸收促进剂都具备所有的这些特性。效益/风险性评价将决定一个化合物能否作为吸收促进剂。已研究的吸收促进剂范围很广,本节概括了研究最多的化合物。

1. 乙醇和多元醇类

一些溶剂能够去除角质层中的脂质,一些外用制剂(如凝胶类)和透皮储库系统含有高浓度的乙醇,能够改变皮肤的脂质含量^[2]。不仅乙醇,其他的如丙二醇、*N*-甲基吡咯烷酮和乙二醇单乙基醚(Transcutol™)也能通过增加药物在皮肤中的溶解度,从而提高药物透皮转运的量。据报道,丙二醇的活性是由于溶解了角质层中的 α -角蛋白,从而减少药物-组织结合,促进渗透。

2. 胺和酰胺类

一些辅料可以渗透到皮肤的脂质结构中,打乱有序的填充方式,使结构流动性增大,从而使扩散系数增大。在这方面,氮酮®及其类似物已有广泛研究。有文献表明,氮酮®极性头部基团的氢键很可能同皮肤鞘磷脂相互作用^[3]。Godwin 等^[4]比较了一系列吡咯酮化合物的促渗能力,包括那些具有不同键长和官能团的化合物。以氢化可的松作为模型药物,使用离体裸鼠皮肤模型,*N*-十二烷基-2-吡咯酮及其乙酸酯类似物是两种最有效的渗透促进剂。也有许多研究是有关氮酮®及其类似物的作用机制。具有较短烷基链的化合物,如*N*-甲基吡咯酮,似乎不影响相变温度,很可能通过溶解而非从结构上改变皮肤的屏障功能来起作用。Hadgraft 等^[3]的研究表明氮酮®及其类似物降低多层 DDPE 脂质体相变温度的能力同它们促进渗透的能力一样强。这表明促渗剂的活性可能同脂质层的流动性有关。

对于促进剂某些基团的构效关系的研究表明,分子中

存在环结构对判断促进剂的效果有重要的作用。烷基链长在 $C_8 \sim C_{16}$ ^[5] 之间的化合物对皮肤屏障功能的破坏效果最强。然而,这些分子具有潜在的刺激性^[6]。最近,Hadgraft^[7]描述了某些具有类似结构但刺激性较小的新化合物。

尿素通过促进角质层的水合和形成亲水通道而促进透皮渗透^[8]。

3. 脂肪酸类

干扰角质层细胞间的脂质双分子层可能是脂肪酸(如油酸)促进渗透作用的最主要原因。油酸能够降低皮肤脂质的相变温度,继而增加脂质的移动自由性或流动性^[9]。

4. 萜类

已知单萜和多萜通过增加角质层中药物的扩散和(或)破坏细胞内的脂质屏障增加透皮吸收^[10,11]。已知不同类型的萜烯具有很大的差异,如 *d*-柠檬烯不能破坏细胞内双分子层,而 1,8-桉叶素似乎能在生理温度下干扰脂质^[12]。

薄荷醇也是一种潜在的渗透促进剂,由于它能够分配到角质层细胞间,并能够可逆地破坏细胞间脂质区^[13]。

5. 酯类

酯类作为渗透促进剂的一个典型例子是肉豆蔻酸异丙酯。肉豆蔻酸异丙酯可能表现出双重作用:通过增溶作用影响药物在皮肤和载体之间的分配,并能破坏脂质填充,因而增加脂质流动性^[14, 15]。

6. 亚砷类

人们已发现二甲基亚砷(DMSO)是一种有效的促进剂,但是为了达到预期的效果需要使用高浓度,从而导致不可逆的皮肤损害、红斑和水疱。近来,通过对 DMSO 进行修饰,用芳磺酰基、芳酰基或芳基取代,将氮原子替代氧原子得到新分子。其中,*S,S*-二甲基-*N*-4-溴苯甲酰亚胺硫磺具有最强的效果,但是需要对这些化合物进行更多的活性和毒性研究,尤其是对于不易渗透的模型如人皮肤^[16]更需如此。

7. 环糊精类

环糊精能够形成包合物增加亲脂性化合物的溶解性,但是环糊精与脂肪酸以及丙二醇联合使用,效果似乎比单独使用更好^[17]。

8. 表面活性剂

表面活性剂对皮肤屏障功能的影响取决于它的化学结

构。通常,阴离子表面活性剂比阳离子更有效,而非离子表面活性剂被认为效果最差。大多数阴离子会引起角质层膨胀、 α -角蛋白螺旋的解旋和伸展,从而打开蛋白控制的极性通道^[18]。

阴离子表面活性剂的作用受分子中烷基链长度的影响。链长为十二个碳原子的线性烷基链(如十二烷基硫酸钠)的表面活性剂效果最好。然而阴离子表面活性剂具有刺激性。非离子表面活性剂可能增加角质层细胞间区域膜的流动性(如苜蓿类 Brij®)并提取脂质成分。此外,虽然不太重要,非离子表面活性剂还可能干扰角蛋白链,并引起角质细胞内部混乱^[19]。应该强调,表面活性剂的使用浓度超过它的 CMC 浓度会形成胶团,可能会对药物的生物利用度产生不良影响。

9. 其他促进剂

其他有效的渗透促进剂也有报道,如 *N*-乙酰脯氨酸酯^[20]和单辛酸/癸酸甘油酯^[21]。

需要强调的是,任何促进剂的活性都应该根据所使用的载体功能来评价,并应根据其最终的治疗目的来选择促进剂和载体的混合使用。

黏膜渗透促进剂

在所有的黏膜部位,通常需要联合使用吸收促进剂,亲水性大分子(如多肽或蛋白质)才能达到治疗相关的血浆浓度。表 1 概括了使用和研究最多的吸收促进剂及其可能的作用机制。

表 1 最常使用和研究的黏膜渗透促进剂

类型	例子	作用机制
合成表面活性剂	聚乙二醇单十二醚-9	与膜相互作用
	十二烷基硫酸钠	提取膜蛋白和脂质
	聚山梨酯 20 和 80	增溶多肽
	PEG-8 月桂酸酯	
	司盘 20	
	单月桂酸甘油酯	
	皂苷(如皂树皂苷)	
胆盐	去氧胆酸盐	使蛋白质变性
	甘氨酸胆盐	降低黏液黏度
	梭链孢酸钠	降低肽酶活性
	牛磺二氢梭链孢酸钠	增溶多肽
脂肪酸及其衍生物	油酸	形成可逆胶束
	辛酸	干扰磷脂酰基链
	月桂酸	
	棕榈酰肉毒碱	

续表

类型	例子	作用机制
螯合剂	Na ₂ EDTA	络合钙离子(影响紧密连接)
	枸橼酸	
	水杨酸盐	
包合物	环糊精及其衍生物	增强多肽的稳定性
		增溶
		酶抑制
其他	氮酮	干扰脂质结构

下面介绍最常使用的黏膜给药途径及它们各自使用的渗透促进剂。

1. 口腔和颊黏膜

口腔黏膜与肠道、鼻腔和直肠的上皮细胞膜之间存在很大的差异。口腔黏膜细胞膜比皮肤细胞膜角质化少,细胞间脂质填充更加松散。就吸收促进剂穿过黏膜的功能而言,吸收促进剂主要是通过填充脂质的细胞间空隙产生作用。有人建议,先前应用于皮肤的增加细胞间脂质流动性的机制,也可以应用于口腔黏膜^[22]。报道的用于皮肤的其他机制也能用于口腔黏膜。例如,去氧胆酸盐可以使蛋白质变性并使蛋白质从家兔颊黏膜中析出,影响膜脂质并抑制蛋白酶。

有关系统地比较促进剂结构变化及其对口腔黏膜影响的研究很少。例如,甘氨酸胆盐、聚乙二醇十二醚-9、月桂酸钠和十二烷基硫酸钠对大鼠吸收胰岛素的效果大致相等。一些具有 C₁₂ 疏水尾链的非离子表面活性剂效果较差^[23,24]。

一个有关羧酮类黏膜生物利用度的研究表明,羟丙基- β -环糊精促进吸收的相对生物利用度是没有使用吸收促进剂的 165%。虽然环糊精也可能从细胞间骨架提取脂质,但效果很可能来自对羧酮的增溶作用^[25]。在同一个研究中,牛磺酸-24,25-二氢梭链孢酸钠和去氧胆酸盐不具有任何促进吸收的性质。

2. 鼻黏膜

将吸收促进剂应用于鼻腔多肽和蛋白质给药及其效果的文献有很多。胆盐促进吸收的效果取决于亲脂性:庆大霉素的生物利用度随着三羟基胆盐亲脂性(胆酸盐>甘氨酸盐>牛磺胆酸盐)的增加而增加。鼻腔胰岛素的生物利用度按脱氧胆酸盐、鹅去氧胆酸盐和胆酸盐的顺序依次递减。然而,已有大量文献报道了胆盐对黏膜的严重损害。脱氧胆酸盐的纤毛毒性最大,而牛磺胆酸盐的纤毛毒性最小^[26]。据报道,二氢梭链孢酸钠对多肽如胰岛素的生物利用度的增加效果具有剂量依赖性。

为了评价构效关系,已合成了许多二氢梭链孢酸盐衍生物。酸性衍生物比碱性衍生物具有更好的促渗效果。但



是存在一个矛盾,据报道二氢梭链孢酸盐会对黏膜产生结构性损伤^[27]。

过去,许多研究集中于使用环糊精增加多肽和蛋白质的生物利用度,因为环糊精对鼻黏膜纤毛清除有温和且可逆的作用^[28]。

环糊精中,使用二甲基- β -环糊精(DM- β -CD)对胰岛素大鼠透鼻生物利用度有最强的效果。许多研究报道了环糊精的浓度依赖效应。除了多肽,甲基化的 β -环糊精还用于脂溶性药物的鼻黏膜给药。二甲基- β -环糊精和随机甲基化的 β -环糊精表现出较好的毒理学性质,但必须注意人和动物的生物利用度差异。

3. 阴道黏膜

聚乙二醇十二烷醚-9、溶血磷脂胆碱和棕榈酰肉毒碱是高效的吸收促进剂,但是均会导致上皮层损伤^[29]。将胰岛素用于卵巢切除的大鼠,同时服用牛磺酸二氢梭链孢酸钠、聚乙二醇十二烷醚-9、溶血磷脂胆碱和甘油能显著改善降低血糖的效果。与使用的其他吸收促进剂相比,溶血磷脂甘油酯对阴道上皮的损伤很小^[30]。联合使用溶血磷脂胆碱和淀粉微球,胰岛素生物利用效果较为理想^[31]。

据报道,去氧胆酸盐和皂树皂苷对降钙素在阴道的吸收有很好的效果^[32]。

4. 直肠黏膜

由于膜通透性差和吸收部位的代谢,多肽和蛋白质的直肠生物利用度很低。与其他的黏膜生物利用度试验一样,胰岛素也是直肠吸收研究最多的多肽。

水杨酸钠和5-甲氧水杨酸盐增加了胰岛素的吸收^[33]。甘氨酸钠促进家兔直肠胰岛素吸收的效果比牛磺胆酸钠好,但比去氧胆酸钠和PE-9-十二烷基醚差^[34]。EDTA二钠对直肠黏膜的损伤和促进多种药物直肠吸收的研究也有报道^[35, 36]。

胆盐也被用于促进药物吸收,但是许多研究描述了胆盐用于直肠给药系统引起的严重损伤^[37]。牛磺酸-24, 25-二氢梭链孢酸钠(STDHF)对提高头孢西丁、血管升压素和胰岛素的大鼠生物利用度有确切的效果^[38]。

已表明应用混合胶束,如由非饱和脂肪酸和单甘油酯制成,能促进许多化合物的直肠吸收,包括 α -和 β -干扰素和胰岛素。

5. 肺吸收促进剂

只有少数研究是关于已知的吸收促进剂对难吸收药物(包括多肽和蛋白质)肺部吸收的影响。

据报道,油酸、油醇和司盘85能够增加离体大鼠肺荧光素二钠的转运速率^[39]。甘氨酸盐和司盘85的存在能增加肺胰岛素的吸收^[40]。当使用 n -十二烷基- β -D-麦芽糖吡喃糖苷、甘氨酸钠和亚油酸混合胶束时,异硫氰酸荧光素、胰岛素和降钙素类似物能更好地吸收^[41]。然而,相同的研究者却报道了 n -十二烷基- β -D-麦芽糖吡喃糖苷的毒性。大

量问题仍然存在,如为什么癸酸钠能够增加酚红和异硫氰酸酯标记的右旋糖酐而不是胰岛素和降钙素类似物的生物利用度。

已表明,羟丙基- β -环糊精和二甲基- β -环糊精能够增加大鼠肺部胰岛素的生物利用度,并且有迹象表明它们具有较低的急性黏膜毒性^[42]。

6. 肠道吸收促进剂

提高口服生物利用度具有普遍意义,因为低生物利用度通常导致临床和毒性效应的变化且难以控制。这对于极性分子如多肽和蛋白质极其重要^[43]。

表2概括了最常描述的促进肠道吸收的化合物,并举了一些例子^[44]。

表2 一些常用的肠道吸收促进剂

胆盐	胆酸钠、去氧胆酸钠
非离子表面活性剂	聚山梨酯、聚氧乙烯烷酯类和醚类
离子表面活性剂	十二烷基硫酸钠和十六烷基磺基丁二酸盐
脂肪酸	癸酸钠、油酸
甘油酯	中等链长甘油酯、磷脂
酰基肉毒碱	棕榈酰肉毒碱
螯合剂	EDTA
可膨胀聚合物	聚卡波菲和壳聚糖

应该强调,吸收促进剂可能选择性作用于胃肠道的某些部位。这个事实说明,处方在给药和吸收促进剂的优化过程中起重要作用。

胆盐对药物的肠道吸收具有不同的作用。在某些情况下,由于形成胶束减少药物吸收,而在另一些情况下,由于溶解磷脂或形成 Ca^{2+} 络合物引起的肠道膜干扰作用而增加吸收^[45~47]。

离子和非离子表面活性剂能够增加药物的肠道吸收。一些研究表明,在非离子表面活性剂中,醚比酯更有效,但是情况并不总是这样。有迹象表明,表面活性剂会引起细胞膜损伤,这可能与它们的促进吸收能力有关^[48]。一些表面活性剂可能会影响紧密连接的通透性^[49]。

6.1 脂肪酸

脂肪酸通过对细胞间和跨细胞转运途径的影响而增加肠道吸收。已有一些关于月桂酸、棕榈酸、辛酸和油酸或油酸盐的有意义结果。脂肪酸的细胞毒作用具有浓度依赖性。长链非饱和脂肪酸会引起上皮细胞损伤^[50~52]。

6.2 甘油酯

中等链长甘油酯(主要是 C_8 和 C_{10})能增加难通透药物的肠道吸收,尤其是单和双甘油酯,能改善生物利用度,机理主要是增强了跨细胞通透性。

应该强调,处方对这些甘油酯的效果起重要的作用

(乳化、肠溶性包衣等)。这些产品的主要优势是能够被广泛接受用于口服给药^[53,54]。

最后,应该指出最近十多年,人们认为弱交联聚丙烯酸衍生物和壳聚糖衍生物是用于亲水性化合物的安全渗透促进剂,尤其因为它们具有激发黏膜组织打开紧密连接的作用,并且未表现出任何的急性毒性。聚丙烯酸衍生物具有较好的黏膜黏附性并能抑制消化道酶,如胰蛋白酶、糜蛋白酶和羧肽酶^[55,56]。壳聚糖盐类和 N_1 -三甲基壳聚糖氯化物是降钙素和胰岛素鼻腔吸收促进剂,也是布舍瑞林肠道吸收的有效促进剂^[57]。

参考文献

- Chattaraj, S. C.; Walker, R. B. Penetration Enhancer Classification. *Percutaneous Absorption Enhancers*; Smith, E. W., Maibach, H. I., Eds.; CRC Press: Boca Raton, Florida, 1995; 5—20.
- Bommannan, D.; Potts, R. O.; Guy, R. H. Examination of the Effect of Ethanol on Human Stratum-corneum In Vivo Using Infrared-spectroscopy. *J. Controlled Release* 1991, 16, 299—304.
- Hadgraft, J.; Peck, J.; Williams, D. G.; Pugh, W. J.; Allan, G. Mechanisms of Action of Skin Penetration Enhancer Retarders: Azone and Analogues. *Int. J. Pharm.* 1996, 141, 17—25.
- Godwin, D. A.; Michniak, B. B.; Player, M. R.; Sowell, J. W., Sr. Transdermal and Dermal Enhancing Activity of Pyrrolidinones in Hairless Mouse Skin. *Int. J. Pharm.* 1997, 155, 241—250.
- Bouwstra, J. A.; Boddé, H. E. Human Stratum Corneum Barrier Impairment By *N*-alkylazacycloheptanones: A Mechanistic Study of Drug Flux Enhancement, Azone® Mobility and Protein and Lipid Perturbation. *Percutaneous Penetration Enhancers*; Smith, E. W., Maibach, H. I., Eds.; CRC Press: Boca Raton Florida, 1995; 137—169.
- Bouwstra, J. A.; Peschier, L. C.; Brussee, J.; Boddé, H. E. Effect Of *N*-alkyl-azocycloheptan-2-ones Including Azonew On the Thermal Behavior of Human Stratum Corneum. *Int. J. Pharm.* 1989, 52, 47—54.
- Hadgraft, J. Passive Enhancement Strategies in Topical and Transdermal Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* 1999, 184, 1—6.
- Kim, C. K.; Kim, J. J.; Chi, S. C.; Shim, C. K. Effect of Fatty Acids and Urea on the Penetration of Ketoprofen Through Rat Skin. *Int. J. Pharm.* 1993, 99, 109—118.
- Golden, G. M.; McKie, J. E.; Potts, R. O. Role of S. C. Lipid Fluidity in Transdermal Flux. *J. Pharm. Sci.* 1987, 76, 25—28.
- William, A. C.; Barry, B. W. Terpenes and the Lipid-protein Partitioning Theory of Skin Penetration Enhancement. *Pharm. Res.* 1991, 8, 17—24.
- Cornwell, P. A.; Barry, B. W. The Routes of Penetration of Ions and 5-fluorouracil Across Human Skin and the Mechanism of Action of Terpene Skin Penetration Enhancers. *Int. J. Pharm.* 1993, 94, 189—194.
- Cornwell, P. A.; Barry, B. W.; Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S. Modes of Action of Terpene Penetration Enhancers in Human Skin: Differential Scanning Calorimetry, Smallangle X-ray Diffraction and Enhancer Uptake Studies. *Int. J. Pharm.* 1996, 127, 9—26.
- Kunta, J. R.; Goskonda, V. R.; Brotherton, H. O.; Khan, M. A.; Reddy, I. K. Effect of Menthol and Related Terpenes on the Percutaneous Absorption of Propranolol Across Excised Hairless Mouse Skin. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86 (12), 1369—1372.
- Friend, D.; Catz, P.; Heller, J.; Reid, J.; Baker, R. Transdermal Delivery of Levenorgestol 3. Simple Alkyl Esters as Skin Permeation Enhancers. *J. Control. Rel.* 1989, 9, 33—41.
- Sato, K.; Sugibayashi, K.; Morimoto, Y. Effect and Mode of Action of Aliphatic Esters on In Vitro Skin Permeation of Nicorandil. *Int. J. Pharm.* 1988, 43, 31—40.
- Kim, N.; El-Khalili, M.; Henary, M. M.; Strekowski, G.; Michniak, B. B. Percutaneous Penetration Enhancement Activity of Aromatic S, S, -dimethyliminofuranes. *Int. J. Pharm.* 1999, 187, 219—229.
- Vollmer, U.; Muller, B. W.; Mesens, J.; Willfert, B.; Peters, T. In Vitro Skin Pharmacokinetics of Liarozole: Percutaneous Absorption Studies with Different Formulations of Cyclodextrin Derivatives in Rats. *Int. J. Pharm.* 1993, 99, 51—58.
- Rhein, L. D.; Robbins, C. R.; Fernee, K.; Cantore, R. Surfactant Structure Effects on Swelling of Isolated Human S. c. *J. Soc. Cosmet.* 1986, 37, 125—139.
- Walters, K. A.; Walker, M.; Olejnik, O. Non Ionic Surfactant Effects on Hairless Mouse Skin Permeability Characteristics. *J. Pharm. Pharmacol.* 1988, 40, 525—529.
- Harris, W. T.; Tenjarla, S. N.; Holbrook, J. M.; Smith, J.; Mead, C.; Entekin, J. *N*-pentyl *N*-acetyl Prolinate. A New Skin Penetration Enhancer. *J. Pharm. Sci.* 1995, 84, 640—642.
- Cornwell, P. A.; Tubek, J.; Van Gompel, H. A. H. P.; Little, C. J.; Wiechers, J. W. Glyceryl Monocaprylate/Caprate as a Moderate Skin Penetration Enhancer. *Int. J. Pharm.* 1998, 171, 243—255.
- Wertz, P. W.; Squier, C. A. Cellular and Molecular Basis of Barrier Function in Oral Epithelium. *Crit. Rev.*

- Ther. Drug Carr. Systems 1991, 8, 237-269.
23. Aungst, B. J.; Rogers, N. J. Comparison of the Effect of Various Transmucosal Absorption Promoters on Buccal Insulin Delivery. *Int. J. Pharm.* 1989, 53, 227-235.
 24. Aungst, B. J. Site Dependence and Structure-effect Relationships for Alkylglycorides as Transmucosal Absorption Promoters for Insulin. *Int. J. Pharm.* 1994, 105, 219-225.
 25. Voorspoels, J.; Remon, J. P.; Eechaute, W.; De Sy, W. Buccal Absorption of Testosterone and its Esters Using a Bioadhesive Tablet in Dogs. *Pharm. Res.* 1996, 13, 1228-1232.
 26. Ennis, R. D.; Borden, L.; Lee, W. A. The Effects of Permeation Enhancers in the Surface Morphology of the Rat Nasal Mucosa; A Scanning Electron Microscopy Study. *Pharm. Res.* 1990, 7, 468-475.
 27. Kissel, T.; Drewe, J.; Bantle, S.; Rummelt, A.; Beglinger, C. Tolerability and Absorption Enhancement of Intranasally Administered Octreotide Subject. *Pharm. Res.* 1992, 9, 52-57.
 28. Merkus, F. W. H. M.; Verhoef, J. C.; Martinn, E.; Romeijn, S. G.; van der Kuy, P. H. M.; Hermens, W. A. J. J.; Schipper, N. G. M. Cyclodextrins in Nasal Drug Delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1999, 36, 41-57.
 29. Richardson, J. L.; Minhas, P. S.; Thomas, N. W.; Illum, L. Vaginal Administration of Gentamycin to Rats. *Pharmaceutical and Morphological Studies Using Absorption Enhancers.* *Int. J. Pharm.* 1989, 56, 29-35.
 30. Richardson, J. L.; Illum, L.; Thomas, N. W. Vaginal Absorption of Insulin in the Rat—Effect of Penetration Enhancers on Insulin Uptake and Mucosal Histology. *Pharm. Res.* 1992, 9 (7), 878-883.
 31. Richardson, J. L.; Farraj, N. F.; Illum, L. Enhanced Vaginal Absorption of Insulin in Sheep Using Lysophosphatidylcholine and a Bioadhesive Microsphere Delivery System. *Int. J. Pharm.* 1992, 88 (1-3), 319-325.
 32. Nakada, Y.; Miyake, M.; Awata, N. Some Factors Affecting the Vaginal Absorption of Human Calcitonin in Rats. *Int. J. Pharm.* 1993, 89, 169-175.
 33. Nishihata, T.; Rytting, J. H.; Kamada, A.; Higuchi, T.; Routh, M.; Caldwell, L. Enhancement of Rectal Absorption of Insulin Using Salicylates in Dogs. *J. Pharm. Pharmacol.* 1983, 35, 148-151.
 34. Yamamoto, A.; Hayakawa, E.; Kato, Y.; Nishiura, A.; Lee, V. H. L. A Mechanistic Study on Enhancement of Rectal Permeability to Insulin in Albino Rabbits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992, 263, 25-31.
 35. Nishihata, T.; Tomida, H.; Frederick, G.; Rytting, J. H.; Higuchi, T. Comparison of the Effects of Sodium Salicylate, Disodium EDTA, and Polyoxyethylene 23-lauryl Ether as Adjuvants for the Rectal Absorption of Sodium Cefoxitin. *J. Pharm. Pharmacol.* 1985, 37, 159-163.
 36. Nishihata, T.; Lee, C. S.; Rytting, J. H.; Higuchi, T. The Synergistic Effects of Concurrent Administration to Rats of EDTA and Sodium Salicylate on the Rectal Absorption of Sodium Cefoxitin and the Effect of Inhibitors. *J. Pharm. Pharmacol.* 1987, 39, 180-184.
 37. Murakami, T.; Sasaki, Y.; Yamajo, R.; Yata, N. Effects of Bile Salts on the Rectal Absorption of Sodium Ampicillin in Rats. *Chem. Pharm. Bull.* 1984, 32, 1948-1955.
 38. Van Hoogdalem, E.; Heijligers-Feijen, C. D.; Mathot, R. A. A.; Wackwitz, A. T. E.; Van Bree, J. B. M. M.; Verhoef, J. C.; de Boer, A. G.; Breimer, D. D. Rectal Absorption Enhancement of Cefoxitin and Desglycinamide Arginine Vasopressin by Sodium Tauro-24, 25-dihydrofusidate in Conscious Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989, 251, 741-744.
 39. Niven, R. W.; Byron, P. R. Solute Absorption from the Airways of the Isolated Rat Lung. 2. Effect of Surfactants on Absorption of Fluorescein. *Pharm. Res.* 1990, 7, 8-13.
 40. Okumura, K.; Iwakawa, S.; Yoshida, T.; Seki, T.; Komada, F. Intratracheal Delivery of Insulin; Absorption from Solution and Aerosol by Rat Lung. *Int. J. Pharm.* 1992, 88, 63-73.
 41. Yamamoto, A.; Fujita, T.; Muranishi, S. Pulmonary Absorption Enhancement of Peptides by Absorption Enhancers and Protease Inhibitors. *J. Controlled Release* 1996, 41, 57-67.
 42. Shao, Z. Z.; Li, Y. P.; Mitra, A. K. Cyclodextrins as Mucosal Absorption Promoters of Insulin. 3. Pulmonary Route of Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1994, 40, 283-288.
 43. Swenson, E. S.; Curatolo, W. J. Intestinal Permeability Enhancement for Proteins, Peptides and Other Polar Drugs—Mechanisms and Potential Toxicity. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1992, 8, 39-92.
 44. Aungst, B. J.; Saitoh, H.; Burcham, D. L.; Huang, S. M.; Mousa, S. A.; Hussain, M. A. Enhancement of the Intestinal Absorption of Peptides and Nonpeptides. *J. Controlled Release* 1996, 41, 19-31.
 45. Kakemi, K.; Sezaki, H.; Konishi, R.; Kimura, T.; Murakami, M. Effect of Bile Salts on the Gastrointestinal Absorption of Drugs 1. *Chem. Pharm. Bull.* 1970,

- 18, 275—280.
46. Kidron, M.; Baron, H.; Berry, E. M.; Ziv, E. The Absorption of Insulin from Various Regions of the Rat Intestine. *Life Sci.* 1982, 31, 2837—2841.
47. Feldman, S.; Gibaldi, M. Physiological Surface-active Agent and Drug Absorption 1. Effect of Sodium Taurodeoxycholate on Salicylate Transfer Across the Everted Rat Intestine. *J. Pharm. Sci.* 1969, 58, 425—428.
48. Swenson, E. S.; Milisen, W. B.; Curatolo, W. Intestinal Permeability Enhancement; Efficacy, Acute Local Toxicity and Reversibility. *Pharm. Res.* 1994, 11, 1132—1142.
49. Anderberg, E. K.; Artursson, P. Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture 8. Effects of Sodium Dodecylsulfate on Cell Membrane and Tight Junction Permeability in Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells. *J. Pharm. Sci.* 1993, 82, 392—398.
50. Muranushi, N.; Mack, E.; Kim, S. W. The Effects of Fatty Acids and Their Derivatives on the Intestinal Absorption of Insulin in Rats. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1993, 19, 929—941.
51. Anderberg, E. K.; Lindmark, T.; Artursson, P. Sodium Caprate Elicits Dilatations in Human Intestinal Tight Junctions and Enhances Drug Absorption by the Paracellular Route. *Pharm. Res.* 1993, 10, 857—864.
52. Sawada, T.; Ogawa, T.; Tomita, M.; Hayashi, M.; Awazu, S. Role of Paracellular Pathway in Nonelectrolyte Permeations Across Rat Colon Epithelium Enhanced by Sodium Caprate and Sodium Caprylate. *Pharm. Res.* 1991, 8, 1365—1371.
53. Unowsky, J.; Behl, C. R.; Beskid, G.; Sattler, J.; Halpern, J.; Cleeland, R. Effect of Medium Chain Glycerides on Enteral and Rectal Absorption of Beta-lactam and Aminoglycoside Antibiotics. *Chemotherapy* 1988, 34, 272—276.
54. Constantinides, P. P.; Scalart, J. P.; Lancaster, C.; Mareello, J.; Marks, G.; Ellens, H.; Smith, P. L. Formulation and Intestinal Absorption Enhancement Evaluation of Water-in-oil Microemulsions Incorporating Mediumchain Glycerides. *Pharm. Res.* 1994, 11, 1385—1390.
55. Luessen, H. L.; Lehr, C. M.; Rentel, C. O.; Noach, A. B.; Junginger, H. E.; de Boer, J. C.; Verhoef, H. E. Bioadhesive Polymers for the Peroral Delivery of Peptide Drugs. *J. Controlled Release* 1994, 29, 329—338.
56. Luessen, H. L.; de Leeuw, B. J.; Langemeyer, M. W.; de Boer, A. G.; Verhoef, J. C.; Junginger, H. E. Mucoadhesive Polymers in Peroral Peptide Drug Delivery. Part 6. Carbomer and Chitosan Improve the Intestinal Absorption of the Peptide Drug Buserelin In Vivo. *Pharm. Res.* 1996, 13, 1668—1672.
57. Kotzé, A. F.; Luessen, H. L.; de Leeuw, B. J.; de Boer, A. G.; Junginger, H. E.; Verhoef, J. C. Comparison of the Effect of Different Chitosan Salts and *N*-trimethyl Chitosan Chloride on the Permeability of Intestinal Epithelial Cells (Caco-2). *J. Controlled Release* 1998, 51, 35—46.

(金玉琼 陈 昂 译)

现代调剂学

Lloyd V. Allen, Jr.

International Journal of Pharmaceutical Compounding, Edmond, Oklahoma, U. S. A.



引言

药剂师是一种特殊的职业，他们在自然、物理、医药卫生等学科接受良好的培训，并且对可能在职业生涯中发生的某一错误所引起的潜在悲剧很敏感。药剂师多年来所展示的专业技能、举止风范和职业方式使他们成为社会中最受尊敬和信赖的人。通过与患者的相互接触，提供所需的治疗药物，为使患者恢复或维持一定程度的健康而工作，以及在需要的时候能及时赶到，使得药剂师享有及时雨的美誉。

药学是不同实践和实践场所的复杂混合体。药房不再是简单的社区药房或医院药房了。它是多种多样的，且为那些愿意到处寻找合适的工作和药房实践以满足自己社区患者需要的人们提供了许多机会。药物配方是一个发展迅速、为患者以及健康从业者提供所需药品和服务的领域。大多数的配方药剂师对他们的工作非常感兴趣。事实上，许多药剂师现已意识到通过制备专门药品向患者提供个性化医疗服务的重要性。配药从一开始就已成为药剂师所享有的职业特权。即使是今天，药学的定义仍包括“药物的制备”^[1,2]。

药学是制备和保存药品的技术和艺术，根据医生的处方配制和分发药品^[3]。

配药一直是药房工作的基本组成部分，药品、剂型和设备/技术是不断变化的。药剂师掌握的知识和技能是独一无二的，其他职业的人员是无法模仿的。使医疗服务个性化的药房活动包括配药和临床功能；缺少任何一个方面均会使药房处于不利的地位。利用药剂师的专业技能调整用药剂量、频率和剂型提高，对患者的依从性是很重要的。所有药剂师均需要懂得配药的可选性。

药剂调配由于家庭保健的影响，以及无法得到的药品（尤其是儿科制剂）、罕用药、兽用药和生物技术药品的影响，其作用正迅速加大。新出现的剂型 and 治疗方法使得个性化的药剂和相关产品的调配变得越来越普遍。

药房配药人员称为药剂师，他们为将处方吸引到自己的药房这一明确的目的而积极地推广和提供处方配药服务。配药者责任之一是积极参与到患者的临床评估中去，这是为了协助处方医师确定患者专用的配方以便临时配用。此外，当确定个体化的制剂和剂型的运用时，需要药剂师与处方医师和患者相互配合。先前的研究已验证了临床技能的使用和与处方医师/患者的相互配合，是提高药剂师工作满意程度的内在因素^[4~7]。因此，能利用临床技能且能与处方医师及患者相互配合的配药师通常比那些不需要这些责任的非配药师倾向于获得更高的工作满意度^[8]。

药剂调配比药房许多其他工作需要在数学、自然科学和技术方面进行更多的知识培训。药剂调配知识是科学地支撑药物分发和使用的药学专门知识。最近的历史使人询问我们是否进入角色，一些药学教育人员认识到并欣赏药学科学已经且将继续对药学职业和卫生健康做出贡献。药学科学使得我们变得与众不同。药学学科提供将我们带到患者的病床前的特殊价值。没有其他的医疗卫生职业能够给药物治疗决定带来这些概念，如 pH、粒子大小、分配系数、蛋白结合、构效关系、经济学以及流病病学。药学科学与药学教育的药学基础的结合使得药剂师成为医疗团队中不可或缺的参与者^[9]。

此外，药学实践的什么领域有与通过临时配药进行个性化患者治疗的药剂师一样多的使用科学教育和培训的机会呢？药学科学，尤其是化学和药剂学，是药剂师为满足患者需要而配制特定剂型能力的基础。

调剂的定义

国家药房协会将调剂定义为药物或装置的制备、混合、装配、包装，以及贴标签。①作为从业者的处方药指令，或在执业实践中基于药剂师/患者/医生关系行为的结果；②作为研究、教学或化学分析的目的，而不是用于销售或配药。调剂也包括基于惯例在处方指令之前的药物和设备的制备^[10]。

调剂对不同的药剂师可能有着不同的含义。这可能包括口服液体、局部用药和栓剂的制备。也可能包括一种剂量或剂型向另一种的转变，如从化学药品原料制备选择剂型、准备静脉注射混合物、注射用营养液、用成人剂型调配儿科剂型、放射性同位素的制备或家庭中给药用的托架、试管和其他装置的制备。

调剂的类型

1. 非卧床护理调剂

如果一个患者能够走路，这个患者便被认为是能走动或非卧床的，即患者活动不限于床上。因此，大部分药剂师均参与到非卧床护理中，且大部分患者是门诊患者。这一名词通常用于可走动的家庭护理患者和住院患者。非卧床患者常常能自己取药、储备，有必要时配制药物及自己服药^[11]。在现今的健康护理中，这看起来是非常不协调的，因为我们更加意识到每一位患者都是一个个体，必须按个体来对待，一些从事健康护理的人士将患者按治疗和



第三方赔偿分类。而且，他们是依据医疗保健组织的护理水平而确定“类型”的，并且是通过药物制造商所提供的固定剂量的产品而使用“分类”的，因为市场需求高才能充分证明他们的生产和产品是恰当的。因为，特定商品规定了患者的治疗，那么这些产品什么时候可用，什么时候不可用呢？

当重点持续由住院患者护理向非卧床护理转移时，药剂师有机会拓展他们在护理患者中的工作。非卧床患者护理通常鼓励一个团队朝提高健康水平、预防、健康保养、风险评估、早期预测、管理、治疗和康复方向发展^[12]。非卧床护理通过药剂调配向个性化患者护理提供了许多机遇。事实上，这是大多数药剂师工作的领域。

药剂师在护理非卧床患者中的作用包括以下方面：①配药；②调剂；③咨询；④减小医疗失误；⑤提高依从性；⑥治疗药物监测；⑦减小花销^[11~13]。对于非卧床患者，大部分花销用在调剂或配药中，用在咨询、减少医疗失误、提高依从性、治疗监控的资金很少；然而，这些工作却是非常重要且应该做的。由于调配药物的独特性，对于患者来说咨询是必不可少的。从先前对非卧床护理药剂师工作的讨论中，很明显临时调配在非卧床护理中相当重要。

2. 公共机构药房的调剂

健康护理业永恒的责任是在有利的环境中使用最好的方法为患者提供最有效的护理。这需要行政部门、医疗人员、职员（尤其是与药物使用有关的护士和药剂师）的协作，也必须包括患者。公共机构和公共机构药房迎接挑战的最有效方法之一是在公共机构药房内提供不断扩展的现代临时调配服务。当通过能解决问题的方式向医生提供所需要的选择，通过接受能展示他们技术和学术的新挑战激励机构药剂师时，药物治疗和药剂调配能给机构节约资金。

机构药剂师总是活跃在为患者配药或制备药物的工作中。通过配制药物提供日常静脉注射治疗。由护士日常计算、配药、调剂给予抗生素、全注射营养液、静脉注射附加物和许多其他药物。儿科制剂的制备也成为一些机构工作的重点。

机构人员不断阅读期刊文献，学习新的思维和工作方法。当医生了解了药物调配的技能、可获得性以及他们拥有所需的任何药物供特定场合使用的剂型和剂量时，他们比以往更需要它。当机构药房的从业人员显示了其专业知识和解决问题的能力，医务人员会一直需要他们^[14]。

在考虑满足患者特殊需要时，机构药剂师必须查看各种用药方式作为可能的解决方法。在传统方式不能满足患者需要时，应考虑临时调配，提高治疗效果，使患者尽快恢复出院是最终的目的。个性化剂型、剂量大小和替代的给药途径能够帮助达到这些目的。当医院药房遇到传统方式不能满足患者需要的问题挑战时，提高治疗效果有助于医护人员花时间解决新问题。护理和药房人员将有更多的机会应用他们所学的技能，使药房更多地参与到患者护理中且得到更高的工作满意度。

3. 兽药的调剂

1993年9月举行的关于兽药调配的首次研讨会是供专家讨论的重要的论坛，且是兽药调配史上的转折点^[15]。这次会议之所以重要是由于会议汇集了兽药调配方面的专家，他们开始解释并定义了兽医和药剂师的作用。

美国食品药品监督管理局对兽医调配感兴趣可追溯到20世纪90年代初。公开研讨会的目的是为有广泛影响的、公众的辩论提供一个论坛，以对美国兽医医学协会（AVMA）在兽药调配方面优先于美国食品药品监督管理局（FDA）调配政策指南的公布做出反应。许多发言者就兽医调配和药剂师为兽医调配提出了自己的观点，对主题如利益的冲突、兽医缺少调配方面的训练、“新药”问题和生物等效性标准进行了详细的讨论。

对于兽药调配的必要性有许多原因。例如，对于从非常小的到异常大的多种动物，在没有调配产品的情况下是无法进行有效治疗的。我们会简单地拒绝外来物种或小动物吗？我们会在兽医学方面放弃肿瘤学？

另外，一个有更特定需要的方面是缺乏理想的麻醉药，这促使兽医设计出高质量且对动物危险较低的麻醉组合物。调配对于安全和有效的动物麻醉非常重要。兽医需向各种性情大不相同的动物给予麻醉药，而环境也远不如理想中的好。兽医需麻醉大象、大猩猩、老虎、鸵鸟、鲨鱼、马、牛和毒蛇等许多动物。为什么兽药调配如此重要？还有一些其他的原因包括：①在缺乏调配产品的情况下，多次注射的必要性；②管理的快速变化和兽医学中的疾病问题；③用几种药物在短时间内治疗多种动物的难题；④与动物需大剂量注射相关的资金短缺问题；⑤为了防止动物中毒需预先配制解毒药。

与人用配方药相比较，兽药调配独特的方面包括在可食用动物中使用调配兽药对人体健康的潜在影响，以及在动物反应和大小方面的可变性。

1993年的研讨会阐述了以下一些想法：①兽医对于药物调配需有确切的认识及了解；②药物调配在兽医学的各个方面均是必要的；③调配中毒解毒药的必要性（如亚硝酸钠、硫代硫酸钠、亚甲蓝和乙二胺四乙酸钙）。

出于和目前同样的原因，兽药调配将继续存在，以满足兽医治疗的需要，也满足人类患者的需要。在兽药批准过程中的困难和资金要求促使调配要满足治疗的需要，并不是通过引入治疗用药物来解决。兽医和药剂师之间的相互依赖性不断增强，使得兽药治疗效果达到更高的标准^[15]。

4. 放射药房调剂

放射药学是一种特殊的药学实践，是以服务患者为目标，以科学知识和职业判断，通过确保诊断和治疗中安全、有效地使用放射性药物，以提高及促进健康水平^[16]。放射性药物通常指的是含有放射性元素的药物，是由美国FDA管理的一类特殊的药物。它们之所以特殊就在于包含了作为化

合物一部分的不稳定的核素(放射性同位素),核素在器官和组织中有定位作用。由于放射性药物是有放射性的,核管理委员会或类似的政府机构管理与放射性药物相关的事务。

大部分应用在放射性药物上的放射性核素其半衰期很短。与有较长半衰期的放射性核素相比,当放射性核素半衰期较短时,给予患者时产生影像所需的放射性原子总量是很小的,这对患者而言是有益的。原子总量小降低了对患者的辐射,因此,也就降低了核医疗过程中的危险性。然而,放射性核素的半衰期短导致放射性药物的保存期限短。因此,大多数放射性药物按日配制。放射性药物制备中最常使用的放射性核素是锝-99 m (Tc-99 m)。Tc-99 m 半衰期为 6h,且仅仅放射出 γ 射线,其能量对于测定是非常理想的。

一位核药剂师要能熟练地用 Tc-99m 高锝酸钠和试剂盒配制放射性药物。这些试剂盒是多剂量的小瓶,含用放射性核素 Tc-99m 标记的化合物。瓶内的物质都是无菌、无热原的,如 Tc-99m 锝酸钠。大多数放射性药物是静脉注射给药的,所以核药剂师在配制过程中要保持在无菌环境下进行。

放射药剂师供应放射性药物最通常的地方是商业化的中央放射药房。每天早晨(2:00~3:00)制备放射性药物,单位剂量的药物由汽车运往药房附近的医院。

今天,有上百家商业化的中央放射药房,它们负责供应在核医疗诊断中使用的大部分放射性药物。以前在大型医疗中心和大学由有药理学学士学位教育背景的一些药剂师提供的有限服务发展到由上百位有专业学位的药剂师提供的广泛的服务。的确,在 20~25 年发生了显著的变化,这些变化源自于许多致力于通过产品质量和药学关怀影响患者治疗的企业家。

调配的历史

跨越 5000 年的药房传统集中在向患者供应药品上,药剂师是唯一掌握调配和制备药品知识及技能以满足患者特殊需要的健康专业人士。这一职业的基本责任是为有特殊需要的患者临时配制安全、有效的处方药。

19 世纪调配艺术一直盛行,但逐渐让位于新的技术。据估计,大部分调配知识仍对 20 世纪 20 年代 80% 的处方配药非常重要。尽管为了处方,药剂师越来越依赖从生产商购买的化学药品,但是很多还要人工调配。

20 世纪 90 年代中期,制药行业开始在医疗中使用的大部分药品的生产中取得主导地位,在许多方面提供了优质服务、新方法和一大批在一对一基础上不可能提供的新产品。研究和开发(R&D)已成为药品生产商的标志。然而,提供一种产品数百万剂量的特别种类需要限定剂型(胶囊、片剂、栓剂)和剂量(每一剂量的个体作用强度),从而导致对治疗有一定程度的限制。对于药品生产企业,生产一种产品的 50 种不同的剂量或 15 种不同的剂型以满足需接受治疗的全部患者的需要是不经济的。虽然可满足

大部分患者需要的生产范围被确定了,但是这一方法实际上仍不可能满足所有患者的需要。

我们也必须认识一些个人和他们的健康护理需要并不在理论剂量和剂型种类范围内。然而,大规模生产的厂商不可能为一批患者定制药品,经济上不可能这样做,也不可能满足特定患者或机构不断变化的需要。药剂师的调配能力就是为了填补这一漏洞以满足个性化的需要。由此估计,药剂师通过理解调配的原理和对个人手工技能水平的认识,可能推荐一种药品生产不可能提供的治疗,但是这一治疗在特定时间对特定患者的需要是个性化的。

药剂调配由于受家庭健康护理、难以获得的药品、罕用药、兽药调配和生物技术药的影响而逐渐增加。新出现的剂型 and 治疗方法显示药物调配和个体患者专用的相关产品在临床药学实践中越来越普遍。调剂学之所以独特,在于与其他类型的学科相比,需要更广泛地应用一个人所掌握的自然科学、数学和相关的技术知识。调配药剂师与患者之间的关系是非常独特的,他们与医生携手工作以解决商业生产剂型不可能解决的难题。

调配中的工艺和其他需考虑的因素

以下是与调配处方相关的一些因素:

- 指定剂型、剂量和包装的商品化产品是否能获得?
- 处方是否合理,如辅料、用途、剂量和给药方法?
- 物理、化学和治疗性质是否合适?
- 对于患者的需要,调配处方药是否达到处方医生的目的?

- 是否有替代的、适于患者的剂型、给药途径等?
- 是否可保证辅料特性、质量和纯度?
- 对于调配处方药,药剂师是否接受过专业训练?
- 是否有合适的设备、供应和所需的化学品/药物?
- 是否有关使用、制备、稳定性、给药和储存的文件?

- 药剂师是否能对调配药品进行必要的计算?
- 药剂师对于处方是否能提出一个合理的失效期?
- 药剂师是否能在发药以前进行一些基本质量控制以检查制备情况,如胶囊质量差异、变化、pH、外观?

调配的准则和管理

在提供药剂调配的管理和指南方面,有两个文献非常重要,包括《美国药典》/《国家处方集》(USP/NF)第 795 章“药房调配实践”、第 1206 章“家用无菌药品”和 USP/NF 的其他部分,以及全国药学会联合会颁布的、州政府许可的药房调配操作规范。

1. 美国药典

以下是 USP/NF 中较长章节 1161 章和 1206 章的摘要。795 章中“药房调配实践”可分为:①调配环境;②调





配制剂稳定性；③成分的选择和计算；④允许的剂量、质量和纯度清单；⑤调配剂型；⑥调配过程；⑦调配记录和存档；⑧质量控制；⑨患者咨询^[17]。调配环境部分是关于调配制剂室中应有的仪器设备的标定、维修保养和使用的说明指南。稳定性部分在本章前面已有述及，它对调配制剂有效期的确定有一定指导作用。成分选择在本章的前面也有讨论，并且在样品计算中也有过叙述。USP/NF 中关于允许的剂量、质量和纯度标准是通过一系列有待回答的问题提出的。调配制剂的例子与一些预防措施同时述及。调配制剂制备过程按步骤地列出是为了确保每种制剂活性的一致性。档案部分是描述处方记录、调配记录和应保存的材料安全性数据的。最后的部分包含了患者咨询的各种问题，如正确地使用、储存、调配制剂不稳定的标志等。

第 1206 章“家用无菌药品”包含以下方面：①调剂师的责任性；②风险程度；③验证；④低风险操作；⑤高风险操作；⑥环境质量和控制、成品检查和测试；⑦储存和有效期；⑧药品离开药房后的质量保持和控制；⑨患者和护理工培训；⑩患者监控和投诉系统。配制家用无菌药品的调配药剂师有责任确保产品的制备、标记、控制、存储、配发的合理性。无菌药品的低风险和高风险水平是由各自的事例说明的，灭菌和无菌操作过程的有效性涉及人员、仪器/设备和操作步骤，同时描述了低风险和高风险及其各自的验证。环境质量和控制描述了环境质量、对工作区域和人员的控制步骤、建议的标准操作过程（SOP）以及一个质量监测程序的例子。成品检查和测试描述了最终产品的测试和操作，指导方针仅为那些没有瑕疵、满足所有质量规范的产品才可分发。⑦～⑨讨论了在制剂离开药房后有关制备、储存、有效期的准则，而且护理员或者是患者应该接受培训以确保了解并遵从储存条件、处置和制剂的给药方法。本章中列出了这些培训项目的不同方面，同时也包括书面政策推荐、使用家用无菌药物患者的监测步骤以及副作用的处置和报告。很明显，在本章中调剂师的责任包括：通过药品的合理储存、分发、使用和处置而进行药品调配。

2. 全国药学会联合会

以下是全国药学会联合会调制管理规范的摘要。

A 小节包括一般供应和限制要求，还制定了现行复方调制管理规范的最低要求，此规范适用于由州政府许可为人或动物配药的药房制备药品时使用。此小节还包括以下限制和要求：

基于医生、药剂师与患者的关系和合法处方的存在，药剂师可能会调配在市场上可以买到的合理剂量的药物。药剂师将会收到、储存或使用药物原料，并使用符合官方要求的原料或在 FDA 认证许可的工厂中生产的药物配药。如果以上两条没有一条符合要求，那么药剂师将会根据他们的职业判断力来选择替代的方法。

药剂师在取得有效处方之前，根据以往接到的有效处方，可能会配制少量药物。调配药品只能由有处方权的专

职人员开处方给患者个人，药剂师不可将调配制剂给予其他有州许可的人或商业团体再出售。

B 小节讲述了组织和人员以及调配药剂师和其他涉及调配的相关人员的责任和权利。

C 小节，更深入地阐述了药物调配的仪器设备，而且不仅讨论了原料药和材料，还论述了无菌产品、放射性药物和特别需要警惕的药物如青霉素的调配。

D 小节是关于设备的，指出用于药物调配的设备应设计合理、体积适中，并且为了方便操作和清洁保养应将其摆放在合适的位置。

E 小节关于成分测定、产品包装和密封材料的质量控制。用于药物调配的成分、产品包装盒和密封材料应妥善处理并在储存中避免污染，其相关特性在本小节也有提及。

F 小节是药物调配的质量控制，解释了药物产品调配的书面过程以确保最终产品本身所具有的或表现出来鉴别、剂量、质量与纯度。本小节也讨论了一些可进行的最终质量控制，包括但不局限于以下几点（供参考）：①胶囊装量差异；②混合充分以确保均一性和同质性；③溶液的澄明度、完整性或 pH。

应建立和遵照合适的书面流程以避免已经灭菌的调配药物产品受到微生物的污染。这一流程应包括任一灭菌过程的验证。

G 小节解释了多余产品的标签控制。过多的、符合 A 小节要求的调制产品制备好以后，多余的药品应被标记或参照依据专业鉴别、完整的成分列表、制备日期、按职业判断确定的有效期、合适的检验方法或公布的数据加以记录。

H 小节讨论了记录与报告。保留任何流程和其他按良好调制操作规范要求保留的记录，保留时间应与每个州对保留处方档案所要求的时间一样长。

设备、仪器以及辅助材料

1. 调配设备

推荐在独立进行传统调剂过程的区域中加入一个隔离区，而不是仅仅打扫配发药柜台的一个小角落。调剂师需要一个干净、整洁、光线充足且安静的工作环境。如果进行无菌调配，就要用到有层流罩的洁净室，也要符合各州的药学会的要求。实际上需要的设备取决于将要进行的调配水平。

在所有药物调配区域都应提供充足的照明与通风，饮用水应该在能持续不断地提供正压力的管道系统中输送，如果管道系统有缺陷就会造成调配药物产品的污染。应该提供足够的配药混合区域和方便使用的清洗设备，这些设备应包括但不局限于冷热水、肥皂或洗涤剂、空气干燥器或一次性毛巾。

药物的调配区域应该有一个洁净且卫生的环境，垃圾应该被收取并以及时而清洁的方式抛弃。

2. 调配备置

现今使用的大部分调剂设备都已经发生了变化。今天,电子天平比扭力天平更为常用,微量吸管也随处可见,而且除了标准的冰箱、冰柜,人们有时还使用超冷藏箱。这一领域一直在变化,同时调剂师也应该知道用于制备精确有效处方的可利用的技术和手段。熟识当地实验设备供应商的代表也很有帮助。

需要的设备取决于它的型号及所能提供的服务。医院已经利用层流罩进行灭菌溶液的无菌混合。相同的层流罩也可以用于混合其他的灭菌产品,如滴眼剂。天平特别是电子天平是很关键的。应该购买软膏平刮板和不同种类及材质的刮刀。还应该有研体和杵(玻璃、陶瓷、塑料的)以及一些玻璃器皿。可能没必要买一屋子的仪器设备,但是应该购买开始这项业务所必需的仪器设备,并随着业务的发展而不断建设实验室,扩大到不同地方。

用于药物产品调配的设备应有合适的成分,这样与组分、正在加工的物料或药物产品相接触的表面就不会发生反应、添加或吸附,从而改变药物安全性、鉴别、剂量、质量或纯度。

用于调配的仪器和器皿应在使用前清洗和消毒,这样做可以避免那些对药物产品安全性、鉴别、剂量、质量或纯度有影响的污染。对于那些用于调配灭菌药品的仪器、器皿和容器/密封容器,其清洗、灭菌和保养过程应遵照灭菌药物制剂 NABP 典例第四条。

之前清洗的、用于调配药物的仪器和器皿在使用前必须避免被污染。在开始调配操作之前,药剂师必须检查这些仪器和器皿,并确定其是否适合使用。

自动的、机械的或电子设备和其他种类的设备及相关系统,若能顺利运作,则可以用于药物产品的调配。如果使用这种仪器,就要做日常检查、校对(若必要的话),以确保正常使用。

3. 调配辅助材料

历史上,药剂师一直都在用化学药品和其他材料来调配处方。过去,这些化学药品和材料可从天然产物、原材料以及家用材料中得到。如今,调配药剂师根据化学物质的可获得性来使用各种来源的化学物质。

USP24/NF19 中的《药房调配实践》是这样说的^[17]: USP 或 NF 级的药品是制备所有制剂的首选。如若不可行,另一种高质量的来源[如分析试剂(AR)或美国化学协会认证的药品级]也是职业判断的一个选择。如果不是标准产品或材料,那需附加说明(如分析报告),必须提供给药剂师以保证其合适性。大批量生产的药品可能是活性成分的来源。只有在标有批号和有效期的容器中大批量生产的药品,可被作为活性成分的潜在来源。当用大批量生产的药品进行调配生产时,药剂师必须考虑药品中的所有组分与调配制剂的用途之间的联系。

总之,筛选质量最适合的化学药品来调配药品是药剂

师的职责,把 USP/NF 作为首选,如果不可获得,降低纯度等级,参考表 1,运用专业的判断与鉴别能力。药房应有所选择的化学物质的分析报告并记录在案^[17,18]。

表 1 化学药品等级的描述

等级	描述
工艺或商业化的	质量不确定
化学纯(CP)	更精确但质量仍未知
USP/NF	满足最低纯度标准;遵守由 USP23/NF18 制定的对威胁人类健康污染物的耐受量
ACS 试剂	高纯度;遵守美国化学会化学试剂委员会制定的最低规范
AR	纯度非常高
HPLC	用于高效液相的试剂,纯度非常高
光学纯	纯度非常高
标准品	最高纯度;用于精确的容量分析(作为标准溶液)

调配制剂的稳定性

稳定性是药品可以存留的一个限度,即在具体的限度条件下,在储存和使用一段时间后,药品仍具有与制备时相同的特性。在选择储存条件(温度、光照、湿度)、选择适宜的分发容器(玻璃还是塑料,透明、半透明还是不透明的,盖衬)以及在混合药物和剂型时可以预测其可能发生相互作用的情况下,化学稳定性是很重要的。

1. 影响稳定性的因素

调配的一个重要部分就是要考虑影响最终制剂稳定性的因素,包括 pH、温度、溶剂、水、空气(氧气、二氧化碳、水蒸气)、湿度、粒子大小、离子强度、介电常数、多晶型、结晶、蒸发和吸附。

2. 稳定性的类型和例子

USP/NF 定义了 5 种类型的稳定性,我们将描述其中的 3 种。物理稳定性是描述制剂最初的物理性质,包括外观、口感、均匀性、溶出性和混悬性。化学稳定性指的是每个活性成分在特定范围内都能保持其化学完整性和标示的效价。

微生物稳定性是指符合特定要求的无菌性和抑菌生长性,抑菌剂的存在能在特定范围内保持其有效性。

3. 有效期

上市的产品和调配产品都必须有有效期,许多信息可以用来确定一个合适的有效期,比如说化学工厂、产品文献、实验室数据、期刊、关于该学科的已出版的书籍。通常情况下,大多数药剂师会配制少量的调配产品,储存在阴凉室内,采用一个保守的有效期。在 USP24/NF19795



章标题为“药房调配实践”的引言中说道：

在缺乏特定药品或制剂的稳定性信息时，对包装于密闭、避光容器中，无其他规定储存在室温中的非灭菌调配药物，推荐使用下面的最大有效期：

对非水液体和固体处方（在这里大规模生产的药品是活性成分的原料），其失效期应少于产品有效期的 25% 或少于 6 个月，看哪项先到。

一个 USP/NF 物质是活性成分的来源，其有效期应不长于 6 个月。对于含水处方（由固体成分制备），在低温下保存时其有效期应不长于 14d。

对所有其他的处方，有效期应不长于可能的治疗周期或 30d，看哪项先到。这些失效期界限在有特定制剂适用的、科学可靠的稳定性信息支持时可以延长（如相同药物的浓度范围、pH、辅料、容器、含水量等）^[17]。

调配的质量控制

1. 物理检测

药剂师可以进行很多物理质量控制实验，以确保少量调配制剂的均匀性和准确度。这些质量控制实验包括每计量单位的质量、平均计量单位质量、总产品质量、pH 和一些如外观、味道、气味等的物理观察结果。

2. 物理性质的检查

物理性质检查包括颜色、澄明度、均匀分布、硬度、脆性、脱色、膨胀/变形、结块、气味、沉淀、混浊、形成气体、断裂、形成乳状液、再分散的困难程度、黏度、砂度、干燥度、收缩率、水分蒸发、皱缩和包装上油性污迹的存在。

3. 无菌产品的检查

如果合适，无菌调配制剂产品可能需对其无菌度进行测试，如果存在防腐剂，需对加入防腐剂的有效性进行测试。这种测试可在药房中做也可在合用实验室中做。

4. 热原检查

如果制剂是由非无菌原料制备而成的，尤其要进行热原检查。这种测试可在药房中做也可在合用实验室中做。

5. 合用分析实验室

合用分析检查是用来检查制剂的纯度、效能、无菌度和致热原性。检查的频率通常与容积和产品制备的周期有关。

香料、甜味剂和着色剂

1. 美感产品的制备

当口服给药时，药物的香味、甜味和颜色对于提高患

者的依从性是很重要的。经常通过调整药物的这些性质以满足患者的喜好。

2. 香味的基本和例子

药剂师必须熟悉 4 种主要的味觉（甜、酸、咸、苦），知道选择化学药品性质及气味的联系。应用这一知识，药剂师可用一系列方法降低药品的不良口感，制备大众易于接受的产品。这些方法包括融合、掩盖、物理方法（水不溶性化合物、乳化、泡腾、黏性）、化学方法（吸附、络合）和生理技术（根据一些辅料溶液麻醉作用的负热而冷却）。同样，可使用香味增强剂，包括柑橘强化剂（如柠檬酸、马来酸和酒石酸）。

3. 甜味的基本和例子

根据特定的处方和患者，可使用不同种类的含热量和不含热量的甜味剂。也可考虑一些食后有余味的甜味剂。今天，患者也可以根据自己的情况选择天然或合成的甜味剂。

4. 着色的基本和例子

着色并非总是重要的，但在某些药物中可能是重要的。例如，口服液体通常需用与药物香味相匹配的染料着色。药剂师必须注意所使用的不同油、酒精和水溶性染料。

防腐、灭菌和除热原

1. 防腐的方法

一些调配制剂在自然条件下就可防腐，如一些糖浆剂和酏剂。其他的需额外加入防腐剂。通常在产品中加入防腐剂以抑制微生物的生长，如口服液体、局部用药物及多剂量注射剂。

2. 使用防腐剂需考虑的物理化学因素

选择一种防腐剂应基于它的特性，包括浓度、pH、口感、气味和溶解度。

3. 防腐作用的检查

在一些情况下，建议对常用配方或可能需要延长储存期的制剂进行防腐剂防腐作用的检查。

4. 灭菌的方法

调配药剂师常常采用过程中灭菌，如无菌过滤或最后灭菌、高压灭菌或干热灭菌。在一些情况下，可能与化学灭菌一起综合运用几种方法进行灭菌。

5. 除热原的方法

调配药剂师使用的除热原的方法包括干热灭菌和注射用水洗涤。



调配固体制剂

1. 粉末剂和颗粒剂

粉末剂是干燥、高度分散的药物和赋形剂的完全混合物，可内服也可外用。颗粒剂是由4~10目大小的颗粒构成的剂型。粉末剂和颗粒剂均易配制和使用。现代调配粉末剂的典型处方为

米索前列醇	600g
盐酸利多卡因	500mg
Polyox WSR-301	2.45g
甲基纤维素 E4M Pemium	22.05g

2. 胶囊剂

胶囊剂是将单剂量的粉末、半固体或液体药物包在硬质或软质的包膜或外壳中。现代调配胶囊剂是将内含物如粉末包在油性或半固体囊壳中，也可包在已改良过强度的囊壳中。

处方 右美沙芬 30mg 和硫酸吗啡 10mg 胶囊剂（#100）

氢溴酸右美沙芬	3g
硫酸吗啡	1g
乳糖	35.5g
1号胶囊	#100

处方 三种雌激素 2.5mg 缓释胶囊（#100）

雌三醇	200mg
雌酮	25mg
雌二醇	25mg
甲基纤维素 E4M Pemium	10g
乳糖	23.75g
1号胶囊	#100

处方 三种雌激素 2.5mg 油性胶囊（#100）

雌三醇	200mg
雌酮	25mg
雌二醇	25mg
花生油	20mL (18.38g)
1号胶囊	#100

处方 三种雌激素 2.5mg 半固体填充硬明胶胶囊

雌三醇	200mg
雌酮	25mg
雌二醇	25mg
聚乙二醇 1450	20g
聚乙二醇 3350	20g
1号胶囊	#100

3. 片剂

片剂通常是通过聚集过程压制或制备的固体制剂，包括舌下片、口腔片、咀嚼片、泡腾片和压制片，其中一些很容易配制。下面是研磨片的例子：

处方 氟化钠 2.2mg 研磨片（#100）

氟化钠	220mg
蔗糖粉末	1.15g
乳糖，含水	4.63g

4. 锭剂或糖锭

锭剂或糖锭是在口中慢慢溶解或分解的固体制剂。基质通常带有香味或甜味。调配糖锭包括麻醉（利多卡因）、激素（睾酮）、镇痛（氨基酮）和抗真菌（制霉菌素）等成分。

处方 睾酮 10mg 锭剂（#24）

睾酮	240mg
阿斯巴甜	500mg
硅胶	480mg
阿拉伯胶	360mg
香味剂	适量
聚乙二醇 1450	23g

处方 儿科咀嚼树胶状凝胶

活性药物	适量
皂土	500mg
阿斯巴甜	550mg
阿拉伯胶粉末	500mg
枸橼酸水合物	700mg
香料	适量
树胶状凝胶基质	26.6g

处方 树胶状凝胶基质

明胶	43.4g
丙三醇	155mL
纯水	21.6mL

处方 制霉菌素棒（#10）

制霉菌素粉末	2500 000 单位
70%山梨醇溶液	20mL
单糖浆	50mL
香料	适量
纯水适量	300mL

处方 20mg 丁卡因棒（#30）

盐酸丁卡因	600mg
柠檬香料	0.5mL
食用绿色素	2mL
蔗糖	150g

酒石酸氢钾 500mg
纯水 55mL

5. 栓剂

栓剂是通过直肠、阴道或尿道给药的固体剂型。依据人体给药腔道，栓剂有不同的大小或形状。配方栓剂包括止恶心（劳拉西泮、苯海拉明、氟哌啶醇和甲氧氯普胺）、止痛（吗啡）、抗真菌和直肠及肛门（利多卡因、鞣酸）制剂。

处方 氟康唑 200mg 阴道栓剂

氟康唑 200mg
聚乙二醇基质 适量

处方 硫酸吗啡缓释栓剂

硫酸吗啡 50mg
海藻酸 25%
Witepsol H-15 适量

处方 Gralla 型止吐栓剂

成分	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
甲氧氯普胺	10	—	20	10	40	20	20
氟哌啶醇	0.5	5	—	—	1	1	—
苯海拉明	—	25	25	—	25	25	25
地塞米松	—	—	10	—	10	10	5
劳拉西泮	0.5	2	—	—	1	—	—
地西泮	—	—	—	5	—	—	—
盐酸羟嗪	25	—	—	—	—	—	—
盐酸异丙嗪	—	—	—	25	—	—	—
马来酸苯扎托品	—	—	—	—	1	—	—
二氧化硅	20	30	20	15	—	—	—
脂肪酸基质适量	2g	—	2g	2g	2g	2g	2g
聚乙二醇基质适量	—	2g	—	—	—	—	—

6. 棒剂

棒剂是一种方便的局部给药形式，有不同的大小和形状。棒剂易于传送和配制。调配棒剂包括那些用于治疗疱疹的抗病毒的和用于暴露在环境下的皮肤缓和剂和遮光剂。

处方 氟尿嘧啶 5% 局部用棒剂 (25g/管)

氟尿嘧啶 5g
聚乙二醇 3350 27g
聚乙二醇 300 68g

处方 含遮光剂的阿昔洛韦棒剂 (5g/管)

阿昔洛韦 200mg 胶囊 #5
对氨基苯甲酸 150mg
微粉化硅胶 120mg
聚乙二醇 3350 6.5g
聚乙二醇 300 15mL

调配溶液制剂

1. 溶液剂

溶液剂是液体制剂，包含一种或多种以分子状态分散在适当溶剂中或分散在相互混溶的混合溶剂中的药物。溶液剂可局部使用也可内服。

调配液体包括局部用（疣溶液）、口服糖浆剂和溶剂、鼻腔溶液剂、耳溶液剂、离子导入疗法溶液剂（地塞米松磷酸钠）和许多其他种类。

处方 用于电离子透入疗法的地塞米松和利多卡因溶液剂 (100mL)

地塞米松磷酸钠 200mg
盐酸利多卡因 1g
注射用无菌水 100mL

处方 盐酸丁丙诺啡 150mg/100mL 鼻腔喷雾 (100mL)

盐酸丁丙诺啡 150mg
丙三醇 5mL
对羟基苯甲酸甲酯
(尼泊金甲酯) 200mg
0.9% 氯化钠注射液 95mL

2. 混悬剂

混悬剂是由高度分散的固体分散在液体、固体或气体中所组成的两相系统。当混入的药物不能充分溶解于不同溶剂或共溶剂系统中时，混悬剂是适当的剂型。它们可口服也可局部应用。调配混悬剂包括许多不适宜商品化的儿科剂型的口服液体。针对患者，将商品化的片剂和胶囊剂混入载体，且可按患者的喜好个性化地添加香料。

处方 4% 吡啶美辛局部用喷雾 (100mL)

吡啶美辛 4g
羟丙基纤维素 200mg
十二烷基硫酸钠 100mg
纯水 10mL
95% 乙醇适量 100mL

处方 睾酮 10mg/0.1mL 舌下滴剂 (10mL)

睾酮 1g
淀粉 100mg
硅胶 200mg
香料 适量
杏仁油 10mL

3. 乳剂

乳剂是非均质的系统，由至少一种不溶性液体紧密分散在另一种液体中，以小滴或小球形式存在，半径通常超



过 $0.1\mu\text{m}$ 。它们是由两种主要的不溶性液体组成的热力学不稳定混合物，通过乳化剂将这两种液体混合在一起。调配乳剂可局部使用也可口服。局部用乳剂有乳膏剂和脂质体制剂。调配乳剂包括口服和局部使用的制剂。这一类型也包括普朗尼克-卵磷脂-有机凝胶，是一种渗透-增强剂。

处方 乳剂基质

重液体石蜡	25mL
肉豆蔻酸异丙酯	25mL
聚山梨酯-80	7mL
对羟基苯甲酸甲酯	200mg
尼泊金丙酯	100mg
纯水适量	100mL

处方 普朗尼克-卵磷脂-有机凝胶中含 10% 氯胺酮

盐酸氯胺酮	10g
异丙基棕榈酸盐：豆磷脂 1:1	20g
普朗尼克 F127 20% 凝胶适量	100mL

调配半固体制剂

1. 软膏剂和糊剂

软膏剂是外用于皮肤或黏膜的半固体制剂，在室温下软化或熔化。糊剂是稠而硬的软膏剂，在人体体温下通常不能流动，有保护和覆盖的作用。调配软膏剂和糊剂包括：

处方 鞣酮-薄荷脑低共熔软膏剂（2% 鞣酮）

鞣酮-薄荷脑低共熔混合物	6.33g
亲水凡士林	93.67g

注释：鞣酮-薄荷脑低共熔混合物是将 31.6g 鞣酮与 68.4g 薄荷脑混合，用足够量甲醇溶解，然后蒸干甲醇。

处方 乙酸铝糊剂（100g）

乙酸铝溶液	17mL
无水羊毛脂	34g
Lassar 锌糊剂	49g

2. 乳膏剂

乳膏剂是外用亲水的软性固体或黏稠液体。乳膏剂可能含有溶解或悬浮在水溶性或乳膏基质的药物，可以是油包水或水包油型的。乳膏剂例子如下：

处方 黄体酮 5% 乳膏剂

微粉化的黄体酮	5g
丙三醇	适量
亲水软膏	95g

注释：可使用商品化的水包油载体且黄体酮的量是可变的。

3. 凝胶剂

凝胶剂是由液体渗透到无机粒子或大的有机分子中构

成的悬浮液所组成的半固体系统。有些凝胶剂是透明的，有些则是浑浊的，这可能是由于辅料不是完全以分子状态分散或形成聚集，从而引起光散射。调配凝胶剂包括局部用、口腔甚至直肠给药。如下：

处方 吡罗昔康局部用凝胶

羟丙基纤维素	1.75g
70% 的异丙醇	98.25mL
丙二醇	4.1mL
聚山梨酯-80	1.7mL
吡罗昔康 20mg 胶囊	25 粒胶囊
（可使用吡罗昔康粉末）	

处方 酮洛芬，局部用凝胶环苯扎林和利多卡因

酮洛芬	10g
盐酸环苯扎林	1g
利多卡因	5g
丙三醇	10mL
山梨酸	200mg
卵磷脂：棕榈酸异丙酯溶液	20g

调配无菌制剂

1. 眼用制剂

眼用制剂是无菌、无外源性粒子，专为滴注入眼中而制备，包括溶液剂、混悬剂和软膏剂。调配眼用制剂包括乙酰半胱氨酸、阿昔洛韦、阿替普酶、阿米卡星、两性霉素 B、维生素 C、杆菌肽、葡萄糖酸钙、青霉素、头孢菌素、氨基糖苷、色甘酸钠、环孢菌素、去铁胺、抗炎皮质类固醇、螯合剂、肿瘤药物和许多其他药物，也可制成溶液剂或软膏剂。

处方 乙酰半胱氨酸 15% 眼用溶液剂

乙酰半胱氨酸	15g
注射用无菌水适量	100mL
pH 6~7.5 的氢氧化钠	

2. 吸入性溶液剂

吸入性溶液剂是将药物输送到患者的呼吸道，以发挥局部或全身作用。调配吸入性溶液剂包括一种或几种药物如沙丁胺醇、色甘酸钠、硫酸吗啡、皮质类固醇、异丙托胺、间羟异丙肾上腺素、特布他林和其他药物。

处方 硫酸吗啡 0.25% 吸入性溶液剂

硫酸吗啡	250mg
水合枸橼酸	100mg
无菌注射用水	100mL

处方 硫酸沙丁胺醇和异丙托溴胺吸入性溶液

硫酸沙丁胺醇	100mg
--------	-------

异丙托溴胺	16.7mg
50%苯扎氯胺溶液	0.003mL
0.9%氯化钠注射液	100mL

3. 注射药

注射药是通过注射给药的产品，必须是无菌、无热原和无微粒的。调配注射药包括高剂量的用于患者止痛的镇痛药（硫酸吗啡 50mg/mL）、止呕注射液、用于非卧床镇痛泵的芬太尼和布比卡因注射液、肿瘤合并用药和其他药物。

处方 甲氧氯普胺、氯羟安定和丙氯拉嗪注射液

甲氧氯普胺 (5mg/mL)	30mL	150mg
氯羟安定 (2mg/mL)	0.5mL	1mg
25%甘露醇	50mL	12.5mg
丙氯拉嗪 (5mg/mL)	2mL	10mg
5%葡萄糖注射液		50mL

处方 枸橼酸芬太尼 1.25 μ g/mL、盐酸布比卡因

0.4375mg/mL、盐酸肾上腺素 0.69mg/mL

枸橼酸芬太尼 50 μ g/mL	2.5mL
0.5%盐酸布比卡因	8.75mL
盐酸肾上腺素 1:100 000	6.9mL
0.9%氯化钠注射液	81.85mL

处方 三磷酸吡啶核苷酸溶液

50%葡萄糖注射液	500mL
85%氨基酸电解质注射液	500mL
10%油脂	200mL
葡萄糖酸钙	1g
硫酸镁	2g
微量元素	1 单位
M. V. 1-12	1 单位

生物技术制剂调配

1. 定义

生物技术制剂是应用工程技术通过有生命的有机体产生的。生物技术为调配药剂师提供了一种新颖而独特的治疗药物的来源，当然这需要他们具有相关的专业知识。

2. 制剂的类型

生物技术产品在制备方法和处方中存在的潜在问题是不同的。研究有生物活性蛋白质的调配药剂师主要的兴趣在于它们的稳定性、剂型和给药方式。目前大多数的生物技术产品是蛋白质类，但是很快会有更小的肽类分子出现。

3. 物理化学影响因素

研究生物来源药物，调配药剂师必须了解活性药物成

分和整个药物传递系统或载体。蛋白质一般非常有效，用量很小。药剂师必须熟知这类制剂的载体、缓冲液、稳定剂的要求，还包括表面活性剂、氨基酸、多氢醇、脂肪酸蛋白质、抗氧化剂、还原剂和金属离子的使用，还必须要考虑适当的 pH、螯合剂、防腐剂和张力调节剂。

4. 质量控制和稳定性

为了保持药物在储存期和给药后的生物活性，必须考虑使用蛋白质的影响因素。蛋白质是内在不稳定分子而且它们的降解过程十分复杂。调配药剂师会面临选择药物传递的合适载体，个性化的给药剂量，通过新的药物传递系统来给药，制备药物通过这些系统来传递，监测它们的效能，与使用该药的患者沟通。

生物技术来源产品的处方示例如下：

处方 组织血浆酶原激活剂 25mg/100L 滴眼剂

组织血浆酶原激活剂	20mg 一小瓶
0.9%氯化钠注射液	60mL
无菌注射用水	20mL

兽药制剂调配

1. 兽药调配的准则

出现以下几种情况时可以考虑兽药调配：没有有效的 FDA 认可的产品；现有的剂型不适用；出现多种并发疾病；同时给予两种或更多的药物可以增加治疗效果或降低副作用；由于经济的原因不能使用认可的药物；配方会改善剂量/治疗方案的依从性。

2. 兽药调配需考虑的因素

大多数 FDA 认可的药物是针对某一种属的，如食用动物或大的目标种群。如果兽药公司没有意识到某种产品会有大量的市场，那么他们就不会申请产品认可。这样，就为调配药剂师留下了一个广阔有潜力的市场空间。由于市场需求有限，没有 FDA 认可的供外来种群使用的产品，而且一些常见种群的 FDA 认可产品的数量也是有限的。兽医需要动物使用的特定产品，药剂师了解如何准备这些产品。因而，产生了一种兽医、药剂师、患病动物团队合作的方式。

这一过程中会经常产生一些问题，包括：治疗这种动物的最终目的是什么？有没有商品化的产品可以使用？管理当局关心什么？是食用动物还是产奶动物？会不会产生遗留问题？我们了解这些药物的物理和化学相关性吗？在调配之前、过程中及之后，我们对这些药物的稳定性了解多少？对于活性成分的药动学我们知道什么？会不会有人员在使用药物进行调配的过程中或使用配方时处境危险？

某些兽药制剂示例如下：

处方 乙酰半胱氨酸，庆大霉素，阿托品溶液

乙酰半胱氨酸	720mg
庆大霉素(硫酸庆大霉素)	36mg
硫酸阿托品	36mg
灭菌水适量	15mL

处方 4-甲基-吡唑溶液

4-甲基-吡唑	1g
聚乙二醇 400	9mL
注射用抑菌水适量	20mL

总结

药房调配为药剂师提供了一个从事他们光荣职业的机会。将来这会在药房工作中占有更重要的地位,并且涉及社区、医院、疗养院、家庭保健所、兽医局以及专门机构的药剂师。药剂调配把药剂师的临床专业知识和科学知识结合起来以实现药学关怀。

参考文献

- Allen, Loyd V., Ed. The Compact Oxford English Dictionary, 2nd Ed.; Oxford University Press, Inc.: New York, 1991.
- Allen, Loyd V., Ed. American Heritage Dictionary of the English Language, 3rd Ed.; 1992; In Electronic Form in Microsoft Bookshelf'95, Microsoft Corporation, 1995.
- Allen, Loyd V., Ed. Webster's Revised Unabridged Dictionary of the English Language, G & C Merriam Company: Springfield, MA, 1913; 1075.
- Williamson, R. E.; Kabat, H. F. Job Satisfaction among Minnesota Hospital Pharmacists. Am. J. Hosp. Pharm. 1972, 29, 942-946.
- Humphrys, P.; O'Brien, G. E. The Relationship between Skill Utilization, Professional Orientation and Job Satisfaction for Pharmacists. J. Occupational Behav. 1986, 59, 315-326.
- Johnson, C. A.; Hammel, R. J.; Heinen, J. S. Levels of Satisfaction among Hospital Pharmacists. Am. J. Hosp. Pharm. 1977, 34, 341-247.
- Olson, D. S.; Lawson, K. A. Relationship between Hospital Pharmacists' Job Satisfaction and Involvement in Clinical Activities. Am. J. Health-Syst. Pharm. 1996, 53, 281-284.
- Letendre, W. R.; Shepherd, M. D.; Brown, C. M. Comparison of Job Satisfaction for Compounders and Concompounders. Int. J. Pharmaceutical Compounding 1998, 2 (6), 455-462.
- Penna, R. What Makes Pharmacists Different? . Am. J. Pharmaceutical Ed. 1997, 61 (Spring), 103.
- Good Compounding Practices Applicable to State Licensed Pharmacies NABP; Park Ridge, IL, .
- Popovich, N. G. Ambulatory Patient Care. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed.; Genaro, A. R., Ed.; Mack Publishing Co.: Easton, PA, 1995; 1695-1719.
- Raehl, C. L.; Bond, C. A.; Pitterle, M. E. Ambulatory Pharmacy Services Affiliated with Acute Care Hospitals. Pharmacotherapy 1993, 13 (6), 618-625.
- Goode, M. A.; Gums, J. G. Therapeutic Drug Monitoring in Ambulatory Care. Ann. Pharmacother. 1993, 27, 502-505.
- Sundberg, J. A. Extemporaneous Compounding in the Hospital Pharmacy. Int. J. Pharmaceutical Compounding 1997, 1 (5), 314-317.
- Proc. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 1994, 204 (2), 189-305.
- Shaw, S. M. Introduction to Nuclear Pharmacy. Int. J. Pharmaceutical Compounding 1998, 2 (6), 424-425.
- United States Pharmacopeia XXIV/National Formulary 19; US Pharmacopeial Convention, Inc.: Rockville, MD, 2000; 2128-2143, 2698-2704.
- Food and Drug Modernization Act of 1997.

(滕 洋 陈志明 译)



X

先进的无菌工艺：吹瓶-灌装-封口

Deborah. J. Jones

Norton steripak, Cheshire, United Kingdom

引言

吹瓶-灌装-封口 (BFS, 简称吹灌封) 技术早在 20 世纪 60 年代就发展起来, 最初是用来灌装液体类制品, 如非无菌的医疗装置、食品和化妆品等。现在这项技术已经有了进一步的发展。如今全世界都成功地在无菌操作条件下用吹灌封系统来生产无菌制剂, 如呼吸液、眼科用药和创伤护理产品。

吹灌封是一种先进的无菌加工技术, 在整个过程中, 塑料容器由聚合物颗粒成模挤压而成, 然后灌装、封口都是在—套连续的工序中完成。与容器成型、制备、灭菌、灌装、封口完全独立的传统无菌操作工序不同。

与传统的无菌灌装相比, 吹灌封由于整个过程实现了自动化, 在生产过程中不需要多少工人操作, 所以是一种先进的无菌灌装工艺。因此, 用配置合理的吹灌封机器来进行无菌灌装可以达到很高的无菌度。

吹灌封工艺的概述

药理学上的吹灌封工艺由塑料容器的成型和无菌溶液灌装系统组成, 而塑料容器的成型是采用吹模或真空成模将药用级聚合物挤压而成的。

聚合物颗粒通过隔热螺旋挤压器连续地加入机器的料斗中。在挤压器中聚合物经高温 (一般大于 160℃) 高压 (350bar 以上) 被熔化。然后通过模圈和针形装置挤出形成熔融聚合物两端开口的软管, 称为坯料。将它保存在无菌空气中, 无菌空气由无油压缩空气通过无菌过滤器送入坯料的中心部位。坯料由坯料钳固定在位置上, 有些机器上坯料钳也用来对其进行封底。模具装置分成两部分然后移动至坯料上方并靠近在其周围。通过模型中的真空孔使其成模。成型的塑料用热刀片将连续挤出的坯料切断, 然后在模具和灌注上位来回移动。

灌装心轴由一套灌装针尖组成, 它们固定在保护性的层流中; 在灌装机器中这是很小的一个区域, 通常在该区域送入无菌过滤空气。当模具在层流下时, 灌装针放低进入部分成型容器的颈部, 灌装液注入容器完成灌装。心轴随后回到保护的层流中, 容器由第二套模具装置封口 (顶封), 使吹灌封系统中容器形成颈部并密封。

整个周期只需几秒钟的时间, 因此开口容器最小限度地暴露在周围洁净的房间或层流环境中。模具打开, 从周围多余的聚合物中将灌装好的容器取出来。然后去除多余的聚合物 (通常由特殊的剪切工具进行在线处理)。

液体制品从储料罐或容器送料进入吹灌封机器。在接纳产品前要用适当的方法对产品流动的管路进行灭菌, 产品用在线灭菌级过滤器进行过滤。通常产品流水线上无菌过滤不只一次。

灌装环境

无菌吹灌封机器置于特定的洁净区域中, 粒径 0.5μm 或更大 (或相等) 的颗粒等级在静止状态最低要求要达到 M5.5 (美国联邦标准 209E) 或更高。新一代的吹灌封机器可以在明显降低的粒子水平环境中操作。局部灌装环境或层流, 要有更高的等级, 粒径 0.5μm 或更大的颗粒等级最低要达到 M3.5 (美国联邦标准 209E)。

在机器静止状态下, 总颗粒水平应该满足所要求的规定并用激光粒子计数器 (或其他合适的装置在规定的时间内隔内进行测量以表明一直能符合要求)。

但是, 操作中可存活的污染程度是重要的。对可存活的污染物进行微生物监测须与正常动态活动的常规生产一致。和传统的无菌灌装一样, 洁净区域内的可存活的污染物应该用有效的常规清洁、消毒方案以及采用由经培训人员的洁净室操作来加以控制。吹灌封技术有其操作优越性, 可以使洁净区内的人员不必一直在场。但是, 操作者需进入该区域启动机器并在必要时做一些常规调整以维护机器。一些欧洲论坛要求, 进入 M5.5 (FS209E) 等级洁净室穿着洁净服的标准, 同样也适合较高等级洁净室 M3.5 的要求。

基于以往的生产操作数据, 应该建立和用文件证明常规的微生物环境监测程序, 以表明其能一直符合规定, 同时也对整个的趋势进行监测。通常洁净室的监测方法包括定量空气监测和表面监测。对于提供与长时间操作 (暴露时间长达 4h) 有关的数据, 用放置玻璃平板进行半定量空气监测是有用的洁净室内可存活污染物的推荐限度 (非吹灌封方法所特有)。可以引用不同的指导原则, 包括现行的美国药典 (USP) 和指导编号 91/356/EEC 文件 (对药品生产商和批发商的 MAC 指导原则 1997, 附录 1) (表 1)。应根据操作数据和技术指导原则规定警报和采取行动的级别。

表 1 欧洲药典和美国药典对洁净室微生物限度的指导原则

等 级	气流 /(cfu/m ³)	放置平板 /(cfu/4h)	表面样品 /(cfu/55mm 直径平板)
欧盟等级 C	100	50	25
美国药典 等级 M5.5	20	没有规定	10 (地板), 5 (其他表面)

局部灌装区层流也应该进行监测。虽然在操作时禁止进入这些区域（也是极其危险的），但仍然需要在静态条件下（如在一批产品结束时）对可存活和不可存活的污染物进行监测。在操作过程中安装远程控制手段来取样也是可行的。

吹灌封容器受到环境中污染的途径

如上所述，对于无菌的吹灌封方法，容器的灌装是在无菌过滤空气的层流中进行的。但是，在容器制成和灌装之间有一段非常短的时间，此时，开口的容器以坯料的形式转移到灌装位置，恰好使容器暴露于洁净室的环境中。因此，在这段移动的时间里，就有可能使周围环境中的污染物进入容器。

在形成坯料过程中使用的空气通常是无菌过滤空气。如果不是这样，非无菌空气就可能在坯料形成时进入其中。

在简单的实际试验中可以证明肉汤灌装单元（总共超过44 000）在高污染的环境中生产数日，其结果仍然是无菌的^[1]。为了达到在通常条件下产生的污染程度，可通过频繁的人员活动来污染环境（尽管总体上增加了污染程度）。

在用高浓度个体雾化的枯草杆菌孢子人工污染的环境中进行更多的控制研究，在研究中，环境达到一定污染程度，会导致肉汤灌装单元的污染^[2]。所以在周围环境污染程度为1cfu/m³时，推断结果是污染率应控制在 4×10^6 中只有一个单位。

空气污染物进入吹灌封容器中的途径可以用六氟化硫（SF₆）示踪气体进行研究^[3]。在试验中，将已知浓度的示踪气体释放进入放有无菌吹灌封机器的洁净室内。示踪气体的浓度在充满吹灌封灌装单元后进行测量。研究结论是局部层流空气可有效地保护容器。虽然微生物污染物的沉降不是很有代表性，但也是吹灌封容器内一些房间空气的决定性依据。因此，控制洁净室环境污染是非常重要的。

对于吹灌封大规模模拟（肉汤灌装）的结果有效地证明了用经适当配置和验证的机器，可以实现高度无菌。但是，为了保持高度无菌，在灌装环境中控制微生物污染水平是重要的。

产品成分所带来的污染

正如用传统的无菌灌装一样，为了符合制药GMP要求，在生产的所有环节减小污染是重要的。原料应该具有高质量并进行微生物污染检测。产品生产过程中使用的水，应该是低生物负载和高纯度的（虽然这种要求依赖于所生产的产品本身特性，但最好使用注射用水）。

对于每批产品在不同的生产阶段，应建立生物负载的测试方法和记录。虽然这需视生产工艺而定，但至少应包括在任何灭菌过滤前对大量溶液的生物负载进行分析。应该限定非灭菌环境中大量溶液（通常在混合罐内）的最长使用时间，以防止生物负载增加而超过可接受的水平。此

阶段的生物负载检测应该对持续阶段最后的样品进行取样来获得在最恶劣环境下的数据。

为了准备好生产机器，尤其是像现场清洗（CIP）和在线蒸汽灭菌（SIP）等相关活动，吹灌封技术常常会导致相当长的机器停机时间。为了从完整性和外观上可以让人接受正确灌装容量的药物剂量，必须对机器进行初始调整以满足连续生产。因此，一旦调试完成，就有利于进行大批量样品的灌装。在整个液体制备的所有阶段，为了更容易保持低生物负载，常规方法是将大量产品用灭菌级过滤器过滤后放在已灭菌的容器中。这些已灭菌的溶液随后就送料进入灌装机，这样不会使微生物水平升高。灌装机上靠近灌装点的部分需要更进一步的无菌过滤。可能会在进一步过滤前的灌装阶段装一个取样装置。在长时间的批量生产中，这会在过滤最终阶段前给出数据以确认产品的低（或零）生物负载。

吹灌封容器是用未加工过的高级聚合物粒子制成的，就容器的灭菌而言，已对挤压工艺的破坏性进行了研究，在验证部分对最近的研究结果进行了讨论。聚合物粒子的生物负载试验是为了建立生物负载的底线数据。如果加工存储得当，未加工过的聚合物应该是低生物负载的。

设备维护与维持

为了在高度可信的无菌条件下生产无菌药品，由有经验的、经过培训的、对技术和无菌操作完全了解的人员来操作设备是至关重要的。由于技术的特性，机器运行过程中操作者的干预是有限制的，但是，吹灌封机器很复杂，一些操作者在正常生产中必须时刻在场。为了弄清楚在批量生产中哪些活动是禁止的，哪些是允许的，必须用文件清楚地规定出来。例如，如果发生像灭菌产品通道或在与灌装区域直接相邻的区域内需立即修正的操作错误，通常都是被禁止的，因为它们会导致终止批量产品的生产，而像坯料和灌装容量调整之类的操作属于机器正常操作，是被允许的。虽然应该有为这些操作提供文件证明的程序化方法，但它们可能是机械程序。

根据对所生产产品可能产生的影响，应该对操作干预进行分类，只有那些对产品无菌性没有危险的操作才能在操作中被允许。

对于所有的机器，为了在最低限度的操作活动下使机器运行有效，吹灌封机器必须适当维护。应该有一套备有文件证明的保护性维护程序，并应详细说明与所有机器组成部分和相关系统以及服务进行维护相适的次数。维护应该保证所有活动部分充分润滑（但不要过度），在常规间歇中将过量的润滑剂除去以保持机器的清洁。活动部分之间的摩擦，尤其是软管和固定管道部件，可能是吹灌封机器的问题，这样会引起不希望有的粒子产生和裂缝，从而导致额外的维护和停机时间。在固定的时间间隔内应该对活动部件进行检查以避免磨损，同时要检查的还应包括更换常规的封条，新旧封条应一致。



冷却系统是容器形成时不可缺少的部分，它用来冷却模具。如果可以的话，也可以用来冷却坯料。冷却剂虽然不直接和产品通路接触，但和容器靠得很近，机器维修需防止冷却剂的泄漏。冷却系统易受到微生物污染，通常应该将生物负载量保持可控范围内。冷却系统应该经常取样并测试生物负载量以始终满足预先确定的标准。

吹灌封系统的验证

无菌生产的吹灌封机器以及相关的设备应该用卫生的产品通路设计理念来建造，在生产线上用卫生阀以及最少的管路连接以方便现场清洗和灭菌。

1. 现场清洗 (CIP)

对于相关的所有无菌生产中的机器，所有与产品接触的设备现场清洗是很必要的。这通常包括大容量的混合罐、输送管和吹灌封机器本身，也可能会包括相关输送管上固定的管道。进行现场清洗验证以建立清洗生产设备的常规现场清洗方法，这样可使随后生产的产品污染物不超过预定的要求，这些污染物会改变产品的安全性、性质、质量和纯度。通过在最差产品的生产后（由于其溶解度和活性很难将其清除到可接受水平内）进行清洗验证来建立现场清洗工艺规程。现场清洗效果的判断方法包括直接对产品接触的机器部件上的擦洗物的分析以及冲洗水的分析。当确定好擦洗部位后，需要考虑特定设备的设计需要，并且应该选择那些最有可能存在问题的部位进行分析（如过滤器外罩或可能引起产品堵塞的部位）

2. 在线蒸汽灭菌 (SIP)

在标准现场清洗后，无菌吹灌封机器需要进行在线蒸汽灭菌。在线蒸汽灭菌周期是通过设置在产品流路上固定位置的热电偶来进行常规测量的。进行在线蒸汽灭菌周期的验证以证实整个设备中达到了一致的灭菌温度，保证系统能被有效地灭菌。对于常规使用位置验证应该判别是否合适，或者证明固定探头的位置是否正确。在线蒸汽灭菌的验证一般需要额外的热电偶和使用生物指示剂（适于湿热灭菌）。测试位置应当包括易于接触空气以及冷凝截留的区域。系统精确的工程轮廓图可有助于合适的测试部位的确定并为所选择的测试部位提供文件证明。

3. 无菌灌装合格条件

对无菌灌装合格条件，标准的最合适的方法是用肉汤灌装方法来确定（或培养基灌装）。用这种方法，将液体微生物培养基（通常是最大浓度的通用培养基，如色氨酸大豆肉汤）进行灌装与培养。经过适当的培养后，可以检查其是否受到污染。用这种方法，可以评价灌装过程中的污染程度。

对于吹灌封工艺的肉汤灌装污染，没有合适限定的、可以被直接转换成可接收标准的无菌置信水平。尽管认为

现代的无菌灌装技术如吹灌封可以达到较高的无菌保证水平，而且用肉汤灌装结果可以反映出来，并且应该是公认的、先进技术的可接受标准，但最普遍公认的、可接受标准是 10^{-3} 的无菌可信水平，虽然如此，但像吹灌封这样的现代化无菌灌装技术可以达到更高的无菌保证水平 (SAL)。

肉汤灌装应该是证明新的吹灌封机器可使用的主要验证项目，它在产品生产前进行，用来证明其能无菌加工（通常需要成功进行三次连续的肉汤灌装），并且应该在之后规定的时间间隔内进行再验证。

肉汤灌装应该在能代表正常操作的条件下进行。如果与常规方法有差异，只能按挑战更大的方法进行，而不是更小的。由于吹灌封技术的自动化水平所限，肉汤灌装时要通过外加手段来减少容器污染是极其困难的，因此，结果并不像其他自动化程度低的无菌生产工艺那样可依赖操作人员进行操作调整。

新设备应包括一些背景环境的监测数据。在肉汤批量灌装过程中，获得环境监测数据是很重要的，它可以以此来证明环境污染是否在正常水平。在始终具有比常规批量生产污染水平更低的环境中得到的肉汤灌装结果的正确性才会受到怀疑。

批量生产、存储以及转运应该根据常规工艺规程以及由相同操作员进行。机器应像往常那样清洗和灭菌，尽管通常用过度灭菌周期来进行灭菌，但我们应该选择部分灭菌（尽管仍然符合标准灭菌参数）来作为最差情况。

吹灌封单元灌装的肉汤一般要满足所有产品可接受的标准，如灌装体积、壁的厚度、容器完整度和外观可接受度。在批量生产的开始阶段必要的操作人员活动比在生产的其他阶段有更多可争论的操作。当机器安装调试及一批产品正式开始生产时，常规生产的产品由于其灌装体积、外观以及其他缺陷常会被废弃。但是，在肉汤灌装时，为了证明开始阶段的活动并没有影响产品的无菌状态，保留所有开始阶段的样品并进行培养是一种很好的习惯（除了泄漏的产品）。这些样品应该与随后符合可接受标准的样品分开，并贴上相应的标签。

此外为了获得更多信息，保留并培养那些肉汤灌装过程中（排除泄漏产品）的不合格品可能是有用的。这些产品也应该与合格产品分开并各自贴签。虽然这些样品在正常生产中会被剔除，但这些样品中发现的微生物污染可能预示着一个需要注意的问题。

像常规生产那样，在肉汤灌装过程中，操作人员的活动是必需的。但是，为了证明产品无菌不受影响，多余的一些活动可包括所有被允许的活动。这些干预措施应该是有计划的并且要用文件来证明。

肉汤灌装的频率和数量必须明确规定。灌装数量通常是根据检测微生物污染可接受的低发生率的统计概率而定的。有关这方面已出版了表格^[4]，但吹灌封操作者必须根据其特定设备、常规产品批量以及操作来决定肉汤灌装的量及频率。对于高速吹灌封机器，灌装常规产品批量超



过100 000单位，与传统无菌灌装线相比，这样的肉汤灌装批量是相对较大的，也是既可行又合适的。

肉汤灌装单位的内表面应该完全润湿，这样可保证获取肉汤中任何可能的污染。这通常在培养前或培养中，通过搅拌和倒置产品来达到完全润湿。

培养时间和温度应使常规分离的大部分肉眼可见的微生物生长可以被检测到。这可以用接种低浓度药典规定的

阳性对照来进行常规证明。我们期望通过另外的试验来证明，所选的培养时间和温度会促进取自机器操作环境中的分离菌生长。制药吹灌封操作者联盟推荐培养条件为在25~32℃时培养14d。

1998年，制药吹灌封操作者联盟在调查时将不同吹灌封使用者的肉汤灌装数据汇编成册。这些结果以及较新的数据可见表2。

表2 吹灌封系统肉汤灌装数据

公 司	A	B	C	D	E	F
灌装总数/瓶	6 462 570	222 900	2 697 496	1 534 626	1 042 254	31 600
染菌总数/瓶	3	0	0	0	0	0
污染率/%	0.000 5	0	0	0	0	0

部分培养基的灌装是整个生产批量，单个批量要灌成千上万支样品。除了表中的数字以外，1 500 000份样品中只能有1瓶受到污染。

很明显，在通常情况下进行非常大量的肉汤灌装是不切实际的，但是如果生产的是非防腐产品，在可行的条件下，批量产品后不对机器进行清洗和灭菌直接进行肉汤灌装是一种好的方法。

在培养基灌装中假设其表现出高效性，那么可接受的标准就应该根据实际可达到的水平来定。在标准数量的肉汤灌装中，灌装产品发生任何污染都应该进行调查。在没有找到原因的情况下，甚至是很低程度的污染，都应该考虑机器是否可重新开始使用。

如果在灌装机调整后（改变了灭菌产品的流路或改变了层流），可能对生产能力有所影响，那么也应该考虑机器是否可重新开始使用。

4. 吹灌封容器

吹灌封容器的形成是一个不可缺少的部分，它由药用级未加工过的聚合物颗粒来制得。近期研究发现在用孢子的高生物负载进行挑战试验时挤出过程有破坏性^[5]。测试孢子使用的是干热灭菌方法中的生物指示剂，枯草杆菌黑色变种芽孢，它可以耐干热。用接种了不同水平（ $2 \times 10^1 \sim 2 \times 10^5$ 个孢子/g）的聚合物进行一系列肉汤灌装，然后将肉汤灌装单位按常规进行培养（25~32℃，14d）。在接种高水平孢子的聚合物样品中出现了污染。试验证明了聚合物污染与产品污染的关系，产品污染不仅与聚合物的污染程度有关而且还与污染物对干热灭菌的耐受程度有关（以D值来表示）。在与挤出过程相关的破坏性的充分证据下，研究也证明了颗粒中孢子的非活性。

由于污染物与枯草杆菌孢子相比通常是不耐热的，未加工过的药用级聚合物颗粒常规生物负载试验可以检测到每克聚合物中只有较低的数量或没有。使用吹灌封机器将挤出调整到挤出物操作温度的下限进行详细研究。因此，可以得出这样的结论：由于挤出工艺中生物负载量明显下降或失活，挤出工艺不易受到污染，这适于灌封容器的无

菌成型。这一点可以通过常规肉汤灌装数据得到进一步确认。

吹灌封容器的封口是自动进行的，灌装后由头模装置封口，它可将坯料顶部封住。容器和封口的完整性通常在将灌装产品去除多余塑料（除边）后，在灌装环境之外通过手工或自动检漏方法进行检查。

为了使产品泄漏最小，准确校正模具是很重要的。模子非常细小的错位可能会造成生产样品中极细小的裂缝，常规方法很难检测到。因此，正确的定模是至关重要的，用仔细而有经验的目检常可容易地检查出来。

用细菌挑战试验可很有效地进行容器完整性试验。用这种方法，无菌肉汤灌装产品在含有高浓度细菌挑战的缓冲液（没有规定或指导原则对用哪种微生物有特殊规定，但使用厂家分离菌或像假单孢菌属某些种相对小的微生物是合理的）中浸泡一段时间（即24h）。然后将产品取出，培养，并检查挑战性微生物的生长。没有生长说明药瓶以及封口是完整的。虽然在常规条件下进行这种试验不切实际，但这种方法很灵敏，可能是一种不经常使用的有效手段。

5. 过滤

对于产品和空气的灭菌，在整个吹灌封过程中分别使用亲水和亲油灭菌级的过滤器。过滤器必须从经过认可的供应商处购得，并且需要保证符合无菌级别过滤器的法规要求。通过认可就意味着对于过滤器表面在 1×10^7 cfu/cm²最低浓度的缺陷短波单胞菌（ATCC 19146）水溶液挑战中，过滤器是完全具有细菌截留能力的。

脂溶性的过滤器不会直接与样品接触，进行单独的标准细菌截留试验就足够了。但是，亲水性过滤器与样品直接接触时，对于每种样品，都需要进行另外的验证以证明所选择的过滤器用于产品灭菌不会改变药品的安全性、性质、剂量、质量和纯度。为了证明特定的药物类型进行细菌挑战性试验不会影响过滤器的有效性，亲水性过滤器也要进行评价。通过细菌截留试验验证过滤器，这通常是由过滤器生产厂家和吹灌封操作人员共同协商的，并且试验需要特定的仪器。

X

结论

对于灭菌液体产品的生产, 无菌的制药吹灌封技术在正确操作和安装下具有高水平的无菌保证。随着更多专业技术的发展, 这项技术也在不断地改进。

然而, 为了保持这项技术可达到的高标准, 对可能的容器污染途径和减少这些污染途径的系统操作的认识是很重要的。

参考文献

1. Jones, D.; Topping, P.; Sharp, J. Environmental Challenges to an Aseptic Blow-Fill-Seal Process; A Practical Study. *J. Pharm. Sci. Tech.* 1995, 49 (5), 226—234.
2. Bradley, A.; Probert, S.; Sinclair, C. S.; Tallentire, A. Airborne Microbial Challenges of Blow-Fill-Seal Equipment; A Case Study. *J. Parenter. Sci. Tech.* 1990 July/Aug.
3. Whyte, W.; Matheis, M.; Dean-Netcher, M.; Edwards, A. Airborne Contamination During Blow-Fill-Seal Pharmaceutical Production. *PDA J. Pharm. Sci. Tech.* 1998, May/June.
4. The Use of Process Simulation Tests for the Manufacture of Sterile Products. UK Parenteral Society Technical Monograph Number 4.
5. Birch, C. J.; Sinclair, C. S. Blow-Fill-Seal Extrusion of

Spore Contaminated Polymer; An Exploratory Study. *BFS News* 1998, Sept.

进一步阅读

- MCA Rules and Guidance for Pharmaceutical Manufacturers and Distributors, 1997.
- PDA Technical Report No. 22, Process Simulation Testing for Aseptically Filled Products. *J. Pharm. Sci. Tech. Suppl.* 1996, 50 (S1).
- Points to Consider for Pharmaceutical Blow/Fill/Seal Manufacturing, Sept. 1998; Draft.
- Revision to Annex 1 to the EU Guide to Good Manufacturing Practice, June 5, 1996.
- Sharp, J. R. Manufacture of Sterile Pharmaceutical Products Using Blow-Fill-Seal Technology. *Pharm. J.* 1997, 239.
- Sharp, J. R. Validation of a New Form-Fill-Seal Installation: Principles and Practices. *J. Parenter. Sci. Tech.* 1990, 44 (5).
- Sinclair, C. S.; Tallentire, A. Performance of Blow-Fill-Seal Equipment Under Controlled Airbourne Microbial Challenges. *J. Pharm. Sci. Tech.* 1995, 49 (6).
- USPXXIII. Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Environments; Ch. 1116.

(袁 渊 译)



香料和矫味剂

John M. Lipari Thomas L. Reiland

Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, U. S. A.

引言

使用香料和矫味剂改善食物、药品口味和香味的历史可以追溯到好几个世纪以前，其堪称一门艺术。除了稳定性较好的新半合成矫味剂，很大程度上，现今香料和矫味剂的使用仍和以前一样，相对没有什么改变。但在分析领域，情况则不同。一些精密的仪器分析方法被用来鉴别、纯化和制造；在许多方面，持续快速发展的技术使食物和药品中添加的香料更稳定、有效和独特。本章论述了制药工业中通常使用的香料、矫味剂，介绍了会引起最终产品中香料性能的处方因素。在必要时引用了一些供进一步阅读的相关文献。

香味的定义

香味由味觉、嗅觉和感觉三部分的复合效果组成。一般它使食物和饮料有可口的味道，但是其定义非常不严密。香料的香味是经主观和客观多重影响而产生的感觉。香味的感觉可以是质量上的，也可以是数量上的，可以被衡量。*New Collegiate Dictionary* 是这样定义香味的：“……它是一种物质的质量，会影响味觉……经口会引起味觉和嗅觉的混合物感觉。”这样的定义是正确的，但是并不完善，应该加入感觉的因素后重新定义。

1. 味觉

味觉有四种基本的感觉：甜味、酸味、苦味和咸味。相应的，也有四种不同的味蕾。这些感觉经舌头感受，由大脑译码。在舌头的特定区域感觉某味道会比在其他区域更敏锐^[1]。甜味是最容易在舌尖感觉出来，而苦味最容易在舌头的后部感觉出。酸味在舌头的两侧可以感觉出。咸味通常在舌头的顶部和两侧感觉到。在摄取食物时，味蕾会对溶解的物质做出反应。产生的感觉通过第九颅神经（舌咽神经）传到大脑。第十和第十二颅神经参与感觉反应，但其作用有限^[2]。

2. 嗅觉

香味的嗅觉是意识和潜意识对挥发成分的反应，没有嗅觉，人们就会对很多食物缺少食欲。捏着鼻子吃一口有香味的食物，接着放开鼻子立刻吃一口同样的食物，就会感觉没有香味食物是索然无味的，通常患有感冒的人会经历上述情景。

现在各种各样的香味剂，但是我们还没有建立其结

构和活性之间的关系。但是，有证据表明，气味可能是与一些特殊受体相互作用的结果^[3]，表明香味剂的结构和其特殊气味之间有很重要的关系。

3. 感觉因素

口感是香味中很关键的因素。例如涩味、胡椒辣、薄荷凉和质地（如糖果的软硬）。感觉也对食物整体的味道有作用，如咬脆的芹菜或苹果发出的嘎吱声。口感因素在改善药品的味觉质量方面也很重要。

矫味剂

矫味剂可以分为天然的、人造的或天然-合成香料，即由全天然及合成香料混合而成的^[4]。药用香料有液体（如精华油、液体提取物、酊剂和馏分）、固体（如喷雾干燥颗粒、香兰素结晶、冷冻干燥的肉桂粉末、干柠檬的液体提取物）、糊状物（如软提物、树脂，及所谓的浸膏，它的外部是脆的，里面是软的）。液体香料使用广泛，因为它们很容易扩散到基质内，可以是油性（如精油）或非油性液体。其质地是由制备溶剂决定的。液体提取物可能含有一种，也可能是多种成分。酊剂是将特定的植物或香料放入酒精中浸渍或渗漉制得的。

精油是将植物在高温处煮沸而得，但是有很多直接蒸馏时会降解。真空、蒸汽、分馏或分子蒸馏方法常用于制造精油。分馏可以将微量的水、树脂类材料、色素、萜烯和倍半萜烯从蒸馏物中除去。该步工艺可以改善其可溶性，提高香度。由于除去了起始和末尾的馏分，所以倍半萜烯油比无萜油的溶解度更好（例如，含蜡残油）。在制药工业中最常用的倍半萜烯包括柑橘油和柠檬油。

油和汁经压榨从植物中获得。柠檬精油就是通过这唯一的途径获得的。洗净的生水果用手工和机械冷压，使果皮中的油细胞破裂，通过排水和离心得到油。天然食用香料手工操作是劳动密集型的，现已被机械操作替代。

1. 天然食用香料

自古代以来，天然成分已用于食物的调味以及早期药物的矫味。蜂蜜就是如此，既作甜味剂又作矫味剂。酒可用于药用植物的浸渍。现在已很少将天然香料用于药品中，因为其不稳定，在不同的季节质量也不可控。最常用的天然香料是非萜烯类的柑橘油，如避光和隔绝空气，它就比较稳定。各种其他天然香料也用于食品和制药工业。以下描述一些更常用的香料。



1.1 茴香 (*Pimpinella anisum*, 伞形科)

茴香是一种一年生草本植物,广泛生长在欧洲。将茴香的干果(种子)蒸汽蒸馏后,可以获得精油。蒸馏得到澄清或微浊的浅黄色油。它在低温时会固化,有一种类似甘草的特殊甜味和香味。它的主要成分包括蒈烯脑(大约90%)、甲基对丙烯基苯酚、对甲氧苯基丙酮、乙醛。茴香油常用于液体制剂,它的浓度大约高达3000ppm。

1.2 小豆蔻 (*Elettaria cardamomum*, 姜科)

小豆蔻种植于印度和斯里兰卡,用蒸汽蒸馏其种子可以获得浅绿色至黄色的液体精油,有辛辣、芳香气味,也给人温暖的感觉。一般使用小豆蔻时,它的浓度为5~50ppm。精油的主要成分是柠檬烯、桉树脑、D- α -蒈品醇和乙萘蒈品酯。

1.3 野樱 (*Prunus serotina*, 蔷薇科)

野樱为大型树木,产于加拿大南部,广泛分布于美国和欧洲。它的树皮、小树枝和枝条用于制备液体提取物和酊剂。野樱提取物的主要成分是野黑樱苷,经酶水解得氢氰酸、葡萄糖和苯甲醛。它的主要成分是香豆素、植物甾醇、苯甲酸和脂肪酸(如油酸、亚油酸和棕榈酸)。它的特点是甜、辛辣、类似樱桃的味道。野樱的树皮提取物通常在食物和药品中的浓度为50~800ppm。

1.4 柠檬 (*Citrus limonum*, 芸香科)

柠檬是一常绿灌木,原产于远东;在十字军东征的时候它被传入地中海地区。它的叶子、果实和壳可以整体或部分用于食物、液体或固体制剂中。柠檬精油通过冷压法制得。大约有40种成分已被确定,90%是柠檬烯。液体提出物和酊剂从干果皮中获得。柠檬油通过蒸汽蒸馏从叶子中获得,其气味由萜烯类物质产生,其主要成分是D- α -蒈烯、蒈烯、D-蒈烯、二聚戊烯、L-蒈烯醇、橙花醇和柠檬醛。柠檬橙油广泛使用。使用时,一般浓度范围是1~35ppm。柠檬精油和提取物高浓度使用时,其范围是1000~10000ppm。所有的柠檬油衍生物有特征性的柠檬气味和淡淡的苦味。

1.5 苦橙 (*Citrus aurantium*, 芸香科)

苦橙是一种高大的热带树木,可以长到大约10m高(33ft)。该树原产于远东,在整个地中海、几内亚、西印度群岛、西非和巴西广泛种植。用蒸汽蒸馏法,其叶子和枝条可以制得橙叶精油。橙花酸橙精油是用蒸汽蒸馏法从其花制得的。用压榨和蒸汽蒸馏法可以从果皮中制得橙油。橙油的主要成分是D-柠檬烯、各种酸、醛和二酯。橙油广泛地用于食物和药品,其浓度为500ppm。

1.6 甜橙 (*Citrus sinensis* var. *aurantium dulcis*, 芸香科)

甜橙是一种常青树,可以长到大约6m(20ft)。一般

它原产于东方,在地中海、佛罗里达和加利福尼亚广泛种植。橙油从叶子和枝条中提取而得,但由于使用受到限制,主要应用于香水工业,所以它的产量较低。

甜橙精油通过压榨法得到。它的理化性质(如比重、旋光性和折射率)因原产地不同而各异。其挥发油中超过90%是柠檬烯,还有含量比较高的癸醛、辛醛、十二醛和柠檬醛酯。它有一种特殊的气味和淡淡的苦味、涩味。一般使用浓度为500ppm。

1.7 薄荷 (*Mentha piperita*, 薄荷科植物)

薄荷是一种草本植物,它可以长到大约81cm高。用蒸汽蒸馏法可以由开花植物的顶部制得精油。它种植于欧洲、南北美洲和日本。精油的主要成分是 α 和 β -蒈烯、柠檬烯、桉树脑、乙基戊基原醇、薄荷酮、薄荷醇、异薄荷脑、3-蒈醇乙酸酯和辣薄荷酮。它有一股浓郁的薄荷味,并夹杂着甜香脂的味道,由其强冷却效应所掩盖。它广泛用于食品和液体剂中,其浓度可达8000ppm。

2. 人造矫味剂

与天然矫味剂不同,合成矫味剂一般比较稳定。由于合成矫味剂的发展和仪器分析方法同步,所以天然香料中的活性成分已经确定,人工合成和调配就相对更准确了。然而,精确制备天然香料还是困难的,因为往往微量组分对整体香味的作用很重要。这些微量组分又不容易鉴别出。例如,香草的主要成分香草醛和乙基香兰素。然而,天然香草豆与人造(合成)香草在气味上从没有完全一样过。

3. 天然和人造(N&A)香料

在N&A香料体系中,为了使香味平衡和丰满,将天然香料与合成成分混合。通常根据香料的类型和味觉进行分类。表1列出了N&A香料的成分及其产生的香味。它们常用于食品和药物化合物中。因为厂商对他们所生产的香料配方享有专利权,所以该表并不详尽。许多N&A香料的化学结构很相似,但是其味道和香味却各异。不同厂商生产的类似香料,其成分差异可以很大。有趣的是,链长的很小的改变就可能影响香料的类型。如将苯酸烯丙酯改为环己基酯(如己酸酯或戊酸酯),这样一个微小的变化就可以将樱桃味改为桃子味或菠萝味。

在食品和药品中,N&A香料主要成分从一个分子变成另一个的原位转化是经常发生的。在药物处方研究中,不经意地改变香料的类型,(如pH、盐和温度的作用)可能严重影响香味的质量评价。同一个或相同的N&A香料成分会有几种香味和香气,这表明将一些香料化合物混合会更可取。这样的混合能改善其稳定性。然而,N&A香料的香味并不仅仅由单一成分决定的。基于这些原因,在最终产品中很少使用单一天然香料或人造香料。

表2和表3列出了迄今为止已确定的两种常见水果——树莓和草莓的成分^[4]。这些表格说明用合成的方法仿制天然化合物是很复杂的。因此,N&A香料的用量正在



稳步上升,性能比天然香料好。另外,N&A 香料的质量和均一性比天然香料要好,达到一样的香料效果,使用 N&A 香料的浓度比天然的低。表 4 列出了商用 N&A 草莓香料的配方。其中一小部分是天然香料,大部分成分是合成的。

N&A 香料的另一个优点是矫味剂使用的范围更广,配方设计师可以开发一种独特的天然香料所特有的全新香料体系。在食品和药品中广泛使用的香料类似于什锦水果泡泡糖,详见表 5。

总之,香料有各种各样的种类:天然的、合成的和半合成的。使用时的合适浓度与很多因素有关,包括产品特性,如组成、物理状态、保质期、pH、加工温度、储藏条件和成分的反应活性。产品中使用香料的浓度还和该产品供给的市场区域有关。用户年龄和使用方法是两项与用户有关的因素,对开发产品时香料类型、浓度和品质的选择有重大的影响。

表 1 典型香料成分的基本口味和香味

成 分	基本味道			
	甜味	又苦又甜	苦味	香味的特点
苯酸烯丙酯		×		樱桃味
己酸烯丙酯		×		凤梨味
环己基丁酸烯丙酯		×		凤梨味
环己基己酸烯丙酯		×		桃子/凤梨味
环己基戊酸烯丙酯		×		苹果味
苯氧乙酸烯丙酯		×		蜂蜜/凤梨味
茴香脑	×			茴香味
大茴香醇	×			桃子味
甲酸大茴香酯	×			草莓味
异丁酸苄酯	×			草莓味
柳酸苄酯	×			树莓味
肉桂醛		×		肉桂/瓜味
氨基苯甲酸肉桂酯		×		葡萄味
柠檬醛		×		柠檬味
甲酸香茅酯		×		李子味
环己基己酯		×		桃子/白兰地味
甲酸癸酯	×			葡萄味
联乙醚	×			黄油味
二苯醚	×			黑醋栗味
戊酸乙酯		×		香蕉/苹果味
丁子香酚			×	丁香芽味
香叶醇			×	似玫瑰味
α -紫罗(兰)酮	×			悬钩子味
水杨酸异戊酯		×		草莓味
氨基苯甲酸异丁酯		×		葡萄/草莓味
戊酸异丙基酯		×		苹果味
氨基苯甲酸芳樟酯	×			橘子味
甲基紫罗兰酮	×			树莓/黑醋栗味
丙酸甲酯	×			黑醋栗味
甲基十一酮		×		椰子味
葵子麝香	×			桃子味
橙花醇			×	树莓味
橙花醇乙酯	×			树莓味
橙花醇丁酯	×			可味
丙烯基乙基愈创木酚	×			香草味

续表

成 分	基本味道			
	甜味	又苦又甜	苦味	香味的特点
异丁酸正丙酯	×			凤梨味
玫红醇			×	玫瑰味
乙酸檀香酯		×		杏味
丁酸三联苯		×		李子味
乙酸四氢糠丙酸酯		×		巧克力味/杏味
亚香草基丙酮		×		香草味
乙位萘甲醚	×			草莓味

表 2 悬钩子香味中的天然成分^[4]

酸	羰基	酯	醇
乙酸	乙醛	乙酸丁酯	1-丁醇
丁酸	丙酮	乙酸乙酯	反-2-丁烯-1-醇
己酸	乙酰基甲基原醇	丁酸乙酯	乙醇
辛酸	丙烯醛	巴豆酸乙酯	香叶醇
甲酸	二乙缩醛	丙酸乙酯	1-己醇
2-己烯酸	β , β -二甲基苯胺	2-乙酸己烯酯	顺-3-henen-1-醇
3-己烯酸	己醛	2-丁酸己烯酯	甲醇
异丁酸	2-己醛	乙酸己酯	3-甲基-3-丁烯-1-醇
异戊酸	顺-3-己醛	丁酸己酯	1-戊醇
丙酸	4-(<i>p</i> -羟苯基)-2-丁酮	乙酸异戊酯	1-戊烯-3-醇
戊酸	α -紫罗酮	丁酸异丙酯	
	β -紫罗酮	丁酸甲酯	
	2-戊酮	己酸甲酯	
	2-戊醛	辛酸甲酯	
	丙醛	乙酸丙酯	

表 3 草莓香味的天然成分

酸	酯	醇
乙酸	乙酸丁酯	苯甲醇
苯甲酸	乙酸乙酯	1-茨醇
丁酸	乙酰乙酸乙酯	丁醇
己酸	苯甲酸乙酯	2-茨醇
肉桂酸	碳酸乙丁酯	乙醇
甲酸	己酸乙酯	2-庚醇
异丁酸	肉桂酸乙酯	己醇
异戊酸	巴豆酸乙酯	反-2-己醇
α -甲基丁酸	甲酸乙酯	<i>p</i> -羟苯基-2-乙醇
丙酸	异丁酸乙酯	异戊醇
水杨酸	异戊酸乙酯	异丁醇
丁二酸	α -甲基丁酸乙酯	异葑醇
<i>n</i> -戊酸	丙酸乙酯	甲醇
异戊酸	水杨酸乙酯	1-戊醇
	戊酸乙酯	五亚乙基六胺-1, 3-醇
	反-2-乙烯酯	2-苯乙醇

续表



酸	酯	醇
	反-2-乙酸己酯	<i>n</i> -苯丙醇
	乙酸己酯	DL- α -萜品醇
	丁酸己酯	顺-萜品醇水化物
	乙酸异戊酯	
	丁酸异丙酯	
	乙酸甲酯	
	丁酸甲酯	
	己酸甲酯	
	异丁酸甲酯	
	α -甲基丁酸甲酯	
	乙酸丙酯	
羰基化(合)物		其他
乙醛		乙缩醛
乙酰苯		乙酰甲基原醇
丙酮		γ -十内酯
丙烯醛		1, 1-乙氧基乙烷
<i>n</i> -正丁醛		1, 1-甲氧基乙烷
丁烯醛		二甲氧基甲烷
联乙醛		二甲基硫化物
2-庚酮		氢化硫
甲基-3-丁酮		1-乙氧基-1-丙氧乙烷
顺-3-丁酮		麦芽醛
2-戊酮		1-甲氧基-1-乙氧基乙烷
2-戊醛		甲基硫化物

表 4 典型的人造天然草莓香料处方^[4]

成分	组分质量比
乙酸戊酯	34.0
丁酸戊酯	15.0
茴香脑	1.5
丁酸	15.0
戊酸苯丙烯酯	9.5
联乙醛	10.0
乙基戊酮	15.0
肉桂酸乙酯	52.0
甲基苯基丙三酸乙酯	260.0
戊酸乙酯	60.0
柠檬精油	1.0
麦芽糖醇	70.0
甲基	0.5
橙花精油	0.5
γ -十一(碳)烷酸内酯	58.5
α -紫罗(兰)酮	6.5
戊酸戊酯	15.0
纯茉莉	85

续表

成分	组分质量比
异丁酸苯丙烯酯	7.0
白兰地精油	1.5
乙酸乙酯	50.0
丁酸乙酯	30.0
庚酸乙酯	2.5
丙酸乙酯	15.0
羟苯基-2-丁酮	0.5
(邻)氨基苯甲酸甲酯	6.5
肉桂酸甲酯	35.5
水杨酸甲酯	6.5
鸢尾树脂	1.5
香草醛	70.0
溶剂(乙炔乙二醇乙酯)	1060.0
总计	2000.0

表5 什锦水果香料的处方组成^[4]

成分	组分质量比
乙酸戊酯	300.0
丁酸戊酯	48.0
丁酸乙酯	36.0
α -紫罗(兰)酮	120.0
纯茉莉(酒精中含10%)	0.1
柠檬精油	1.0
鸢尾树脂	80.0
仿玫瑰(酒精中含10%)	28.0
浪姆醚	100.0
γ -十一(碳)烷酸内酯	18.0
香草醛	11.0
乙醇	257.0
总计	1000.0

药物制剂中矫味剂的选择

处方中选择矫味剂有很多规定。不同的香料浓度产生不同的主观感觉。根据药物和产品形式,人们对香料香味的平衡和丰满度提出特殊的要求。因此,药剂师配方选择矫味剂时,必须考虑一些与用户反馈期望相关的参数。一些是产品特性,如处方的黏度、固体或液体、含水率、基质或底物、药物的味道。应当考虑的特殊事项有:

- 在摄取该产品时,可以立刻分辨出配方中的香味;
- 在摄取该产品时,影响口感的因素和在口腔中快速混合的香味要一致;
- 在摄取该产品时,口腔中没有异味感,应有短暂轻微的回味。

矫味剂系统的选择需要许多感官质量的评价。药物所在的基质组成对矫味剂系统的性质有很大的影响。在这些中,甜味剂也许是最相关的。

1. 甜味剂

最常用的甜味剂是蔗糖、葡萄糖、果糖、山梨糖醇和甘油。以蔗糖(糖)作为标准,为100个单位甜度,表6列出了其他甜味剂的相对甜度值。甜度与其浓度有关。据估计当葡萄糖的浓度是8%时,甜度估计是53;但当其浓度为35%时,甜度为88^[5]。甜味剂的甜度伴随着浓度的增大而增大,当其甜度达到最大值时,感觉因素就占主导地位。糖(蔗糖)的浓度为30%,甜度很强烈。其浓度在50%或更高,甜度没有明显不同,但口感(如糖浆、流涎)明显不同。这与其在口腔中对口腔黏膜的渗透性有关。



在固体制剂（如片剂）中限用甘油、葡萄糖、山梨醇和蔗糖，因为它们有吸湿性。D-甘露醇在片剂生产中使用较多，不仅它吸湿性较差，其溶解热也为负值。基于这个原因，含有 D-甘露醇的咀嚼片会有一种清凉的甜味，口味得到改善。人造甜味剂糖精广泛用于食品和药品，其甜度大约相当于蔗糖的 350 倍。在很低的浓度时（相当于 5%~10% 蔗糖），它是甜的，但在高浓度时，是苦的。大约有 20% 的人是“糖精敏感”的，也就是说，即使糖精的浓度很低时，他们也会感觉苦。重复试味几次，糖精的甜味会下降，苦味增加。第三次或第四次试味后，对糖精敏感的人就不再感觉到低浓度溶液的甜味。环磷酸盐和阿斯巴甜糖是人造甜味剂，其甜度大约是蔗糖的 30 倍，但是它们和糖精相似，由甜到苦的改变和浓度有关。阿斯巴甜糖和糖精不同，余味中的苦味并不明显，所以使用比较普遍。环磷酸盐由于可能会致癌，所以在 20 世纪 70 年代被禁用，后来发现这有些言过其实了。

甘草单铵盐的余味中有延迟的甜味，可以将它开发成余味中有轻微苦味的矫味剂。它也有助于增进巧克力的风味。甘油通常用于增加许多化合物的溶解性，也有保湿的作用。糖浆能加强“帽子-锁”效应，蔗糖的结晶在帽子和瓶子的螺纹上，但甘油的加入量在 10%~20% 就能使该效

应最小化。甘油很少在药品中单独用作甜味剂，因为它会使口腔发热，有灼伤感。

2. 增味剂和增效剂

在食品和制药工业中，经常使用增味剂。最常用的有蔗糖、羧酸（如柠檬酸、苹果酸和酒石酸）、食盐（氯化钠）、氨基酸、有些氨基酸衍生物（如味精——谷氨酸钠）和调味品（如胡椒）。尽管在蛋白质和蔬菜中加入谷氨酸钠后味觉效果很好，但在药品中限制使用，因为它不是甜味剂。柠檬酸在液体、固体制剂产品以及食品中最常用于改善产品的味道。其他的酸性物，如苹果酸和酒石酸也用作增味剂。在口服制剂中，这些酸能产生独特、复合的感官效果，全面提升味觉的质量。在液体制剂中，食盐在其味觉阈值浓度起着类似的作用。如香子兰有微弱温和的香味，通过盐的作用，该香味会更强。

3. 遮味剂

一些香料企业的专利产品具有极好的遮味性质^[4]，已得到成功的使用。然而，很多天然、人造香料有相似的遮味作用（表 7）。

表 6 常甜味剂的甜度值

甜味剂	甜度
山梨醇	60
甘露醇	50
氢化水解淀粉	30~40
麦芽糖醇溶液	70~80
麦芽糖醇	90
木糖醇	100
赤藻糖醇	60~70
甘油	55~75
蔗糖	100
果糖	117
麦芽糖	30

表 7 掩味剂和基本味补充剂

基本味	掩味剂
甜味	香草，泡泡糖，葡萄，其他水果
酸	柠檬，酸橙，橘子，樱桃，柚子
金属味	浆果，薄荷，葡萄，药属葵，瓜拿那
苦味	甘草，咖啡，巧克力，薄荷，柚子，樱桃，桃子，悬钩子，橘子，柠檬，酸橙

药品中有许多味道是必须被掩盖的，如经常遇到的苦味，但要完全掩盖它也比较困难。几百年来，在非洲中部有一种用于掩盖土产啤酒苦味的热带水果，称作“神秘果”，含有一种能暂时、选择性的结合苦味糖蛋白。由于糖蛋白的稳定性不佳，所以想从混合物中分离得到它并

用于商业开发几乎不可能。但如果处方中加入抗菌防腐剂，很多果浆在药物处方中就相对稳定了。在许多药品中，用肉桂、橙、柠檬酸、樱桃、可可粉、野樱、树莓的糖浆，或甘草酞剂可以有效地掩盖咸味和苦味^[6]。由于产品中其他矫味剂的相互作用，遮味剂的效果常常难以预料。对苦

味的掩盖效果按如下的降序排列：可可果浆作用最强，其次是树莓果浆、樱桃、肉桂、莰萜、柠檬酸、甘草、芳香酞剂。

药物中的酸味和金属味也可以被掩盖。含盐酸的酸味物质可以被树莓和其他果浆中和。口服液体制剂的金属味（如铁）一般可以用瓜拿那提取物掩盖。瓜拿那可以在固体制剂（如咀嚼片和颗粒剂）中使用，浓度范围为0.001%~0.5%。

矫味技术

1. 限制溶解度法

很多药物在水中可溶，在生理 pH 中广泛电离。在摄取药物时，味道不佳的药物溶解在唾液会产生一种不良的感官味道。选择衍生化或亲脂性的反离子等化学修饰法能有效地降低水溶性和减轻味道。以红霉素为例，因为红霉素是弱水溶性并有苦味的大环内酯抗生素。在 pH 约为 7 时，红霉素一水化合物在水中的溶解度大约是 2mg/mL。将它改为琥珀酸乙酯红霉素后，该药的水溶性小于 50 μ g/mL。该药无味，可以用作液体制剂或咀嚼片。它在体液（如唾液）中的溶解速度可以通过调节处方 pH、固体内容物和温度进一步减小。该技术还可以用于许多药物口味依赖于中溶解度的产品。

2. 囊泡和脂质体

囊泡是主-客体系^[7]，如磷脂和某些表面活性剂，它形成球状或椭圆形、封闭的双层结构。该结构有好几个室，药物以溶液或分散状态置于室内。在各种条件下，这些囊泡都形成封闭的体系，它是理想的掩盖异味的载体，也能在体内调节药物的释放速率。应用这种掩盖异味的方法制备药物而不改变产品的常规状态是一种挑战，如活性物质的化学种类、体外溶出动力学、物理化学稳定性和生物利用度。很多厂商，如美国 Lecithin 公司，都能为食品和药品工业提供完整的磷脂产品线（包括纯化的和在各种载体中增溶的产品）。

3. 微囊法和包衣系统

近来，人们非常关注使用包衣小颗粒达到制剂目的。用适当的聚合物可以将药粒子包裹起来，保留制剂需要的性质，消除不利的特性，如异味。药物粒子包衣可以显著改变药物的释放速率，改善口味、稳定性及其他可调控的性质，如流动性和可压性。在口服制剂中，商用颗粒包衣机可以实现缓释和掩盖异味的效果。使用颗粒包衣技术市场上引入独特的产品线的例子有 Theo-DurR 和 Depakote SprinkleR。Theo-DurR 是将茶碱喷到蔗糖芯上，然后再喷上聚合物来控制药物的释放。将药物包封后，可以阻止药物和味觉受体的相互作用，从而达到消除苦味的效果。其他一些常用的制备微囊的方法有喷雾干燥法、喷雾凝结法、

凝聚和相分离法、界面聚合法、挤压法。

4. 络合和化学修饰

Pennwalt 公司的 Strassenburgh 实验室使用离子交换树脂吸附药物，可以达到缓慢释放^[8,9]的目的，他们在该领域获得一些专利^[10,11]。他们第一项著名的应用是磺酸阳离子交换树脂吸附安非他明（Biphetamine[®]），用于抑制食欲^[12]。在安非他明开创性研究后的几年里，一些药品已开发成产品^[13~16]，如 Ionamin[®]（Medeva 制药公司的芬特明）和 Tussionex[®]（Medeva 制药公司的氢可酮和扑尔敏）和各种感冒咳嗽药品，包括苯丙醇胺、扑尔敏和右美沙芬^[17]。这项技术也用于掩盖异味。

药物从缓释复合物中释放的机理，如由药物和苦味剂组成的离子交换树脂，适用于液体，可以制成再分散颗粒剂或制成混悬剂。通过维持产品中较低的反离子浓度，几乎所有的药物浓度都可维持在骨架中，以便做到高摄取。服用后，体内的离子通过动态平衡激发药物的释放。慢平衡复合物可以使药物缓慢地扩散到味蕾，如药物水溶性较差，也可以消除苦味和其他一些令人讨厌的外观特点。处方中使用的其他络合矫味技术有包合物（如环糊精及其衍生物）、骨架和蜡状材料的物理复合物（如聚乙二醇）。

近年来，制药厂引进了各种新的技术，使用半渗透高分子膜包裹药物颗粒，以达到在体内控制释放的目的。将药物及其吸附物包衣后，既可以控制释放，又可以掩盖异味，其主要原理是减少了药物在口中的溶解度^[18~21]。对上述各种制剂的味道测定结果表明，苦味可以明显减弱^[19~21]，表明包衣和吸附技术可以改善有异味药物的味道。

结语

药物处方中使用香料和矫味剂对于提升药物品质至关重要。香味也是提升患者依从性的关键因素，因为有味味的药物会使人产生厌恶感。但是味觉是一种完全主观的感觉，在迄今使用的许多客观方法中，没有人可以毫无偏见、充分完整地描述味道和香味。

当然也有一定比例的人群对味道并不在意，在辨别各样品的味道、香味的细微差别时，缺少必要的敏锐性^[22,23]。此外，在开发药物剂型时，可以知道该药物的香味差异，然后通过设计技术，改善味的接收程度。使用香料、矫味剂和其他方法改善味道，如将药物用物理化学的方法处理，这些方法可以开发具有极好市场表现的产品。

参考文献

1. Beidler, L. M. Olfaction and Taste; Zotterman, Y., Ed.; Pergamon Press, Inc.; New York, 1963.
2. Pfaffmen, C. J. J. Neurophysiol. 1955, 18, 429—444.
3. Amerine, M. A.; Pangborn, R. M.; Roessler, E. B. Principles of Sensory Analysis of Food; Academic



- Press; New York, 1965; 193—206.
4. Furia, E., Bellanca, N., Eds. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*; CRC Press; Cleveland OH, 1971.
 5. Renner, H. D. *Confect. Prod.* 1939, 5, 255—256.
 6. In *Remington's Pharmaceutical Sciences*; Gennaro, A. R., Ed.; Ch. 69 Mack; Easton, PA, 1980.
 7. Fendler, J. H. *Membrane Mimetic Chemistry*. *Chem. Eng. News* 1984 Jan 2, 25—38.
 8. Martin, G. J. *Ion Exchange and Adsorption Agents in Medicine*; Little, Brown, & Co.; Boston, MA, 1955.
 9. Calmon, C.; Kressman, T. R. E. *Ion Exchangers in Organic and Biochemistry*; Interscience; New York, 1957.
 10. Keating, J. W. US Patent 2 990 332, 1961; US Patent 3 143 465, 1964.
 11. Hays, E. E. US Patent, 3 035 979, 1962.
 12. Deeb, G.; Becker, B. *Absorption of Sustained-Release Oral Amphetamine Preparations in the Rat*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1960, 2, 410.
 13. Swift, J. G. *A Study of Sustained Ionic Release Antihistamines*. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 1960, 124, 341.
 14. Wulff, O. J. *Prolonged Antitussive Action of a Resin-Bound Noscapine Preparation*. *Pharm. Sci.* 1965, 54, 1058.
 15. Brudney, N. *Ion-exchange Resin Complexes in Oral Therapy*. *Can. Pharm. J.* 1959, 59, 245.
 16. Schlichting, D. A. *Ion Exchange Resin Salts for Oral Therapy I*. *J. Pharm. Sci.* 1962, 51, 134.
 17. Raghunathan, Y.; Amsel, L.; Hinsvark, O.; Bryant, W. *Sustained-release Drug Delivery System I: Coated Ion-Exchange Resin System for Phenylpropanolamine and Other Drugs*. *J. Pharm. Sci.* 1981, 70, 379.
 18. Borodkin, S. US Patent 3 947 572, 1976.
 19. Borodkin, S.; Sundberg, D. US Patent 3 594 470, 1971.
 20. Borodkin, S.; Sundberg, D. P. *J. Pharm. Sci.* 1971, 60, 1523.
 21. Borodkin, S.; Yunker, M. H. *Interaction of Amine Drugs with a Polycarboxylic Acid Ion-Exchange Resin*. *J. Pharm. Sci.* 1970, 59, 481.
 22. Cameron, C. W. *The Taste Sense and the Relative Sweetness of Sugars and Other Sweet Substances*, Scientific Report Series No. 9, Sugar Research Foundation, Inc.; New York, 1947.
 23. *Flavor Quality: Objective Measurement*; Symposium, Division of Agricultural and Food Chemistry; American Chemical Society; Washington, D. C., 1976.
- ### 进一步阅读
- Basic Principles of Sensory Evaluation; ASTM Special Technical Publication, No. 433; American Society for Testing and Materials; Philadelphia, PA, 1973.
- Correlation of Subjective-Objective Methods in the Study of Odors and Taste; ASTM Special Technical Publication, No. 440; American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, 1968.
- Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*; Furia, E., Bellanca, N., Eds.; CRC Press; Cleveland, OH, 1971.
- Flavor Quality: Objective Measurement*. Scanlan, ACS Symposium Series, Scanlan, R. A., Ed.; American Chemical Society; Washington, D. C., 1977; 51.
- Flavor: Its Chemical, Behavioral, and Commercial Aspects*. In *Proceedings of the Arthur D. Little, Inc., Flavor Symposium, 1977*; Apt, C. M., Ed.; Westview Special Studies in Science and Technology; Boston, MA, 1977.
- Food Acceptance Testing Methodology*; Advisory Board on Quartermaster Research and Development; National Academy of Sciences-National Research Council; Chicago, IL, 1954.
- Gorman, W. *Flavor, Taste and the Psychology of Smell*; Charles C. Thomas; Springfield, IL, 1964.
- Modifying Bitterness*; Roy, Glenn, Ed.; Technomic Publishing Company, Inc.; Lancaster, PA, 1997.
- Moncrieff, R. W. *The Chemical Senses*; Leonard Hill; London, 1967.

(杨 莉 译)

X

项目管理

Jerry J. Groens

Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, U. S. A.

Cara R. Frosch

Covance Central Laboratory Services, Inc., Indianapolis, Indiana, U. S. A.

引言

公司新产品的开发和引入基本上是通过项目和团队来实现的。新技术的研究和发明也主要是通过项目来完成的。与研究过程相比，新产品开发和引进过程更有条理，也更容易理解，但是它们本质都是项目。

项目是“创造一种独特产品或服务的短时期努力”^[1]。项目管理提供了管理一个项目并使其结果达到或超过股东要求和企盼所需的程序、工具、技术、技能和知识。股东是一些个人或组织，他们的利益受到项目好坏的影响。

有人为了寻找项目管理的资源，查阅了所有工业、环境等方面有关这个主题的图书、论文和案例。这些资料强调每个项目都是不同的，都处于变化的、不确定的、矛盾的环境中。但是还有一些资料阐明“项目管理是一种科学”，所有工业和环境项目管理程序都是一致的。在产品开发或更专业的药品开发领域中，所有具有项目管理成功经验的从业者都知道这种观点是不对的。项目管理与其说是科学，更应该说是艺术，项目管理在工业、环境等领域中的应用是不同的。

例如在建筑业和通讯业中应用的许多项目管理元素在药品开发中就不适用。这些内容包括得到的价值、结构管理和详细的工作流程结构的演示。对于药品或任何产品开发，这些概念实际上提供了太多的结构，对创造、发明和团队的效率会产生潜在的负面影响，所以在药品开发的不确定领域中需要基于项目管理的原则和实践创造一种发展框架。本章主要介绍这一框架。

项目管理框架

一个项目管理的框架有 6 个元素，它们是：

- 项目定义；
- 项目团队和组织；
- 项目计划，时间表和控制；
- 解决问题，决策和模型的应用；
- 高级管理层审阅和控制；
- 积极的实时变化管理^[2]。

每一个元素对成功管理新产品开发项目都很关键。举例来说项目定义程序有：

- 项目的范围和目标；

- 商业方案和技术运用；
- 项目策略和预定目标；
- 新产品的保证和竞争概念；
- 最终产品的性能目标和可行性。

本文将涵盖项目管理框架的每一个元素，并为进一步研究提供参考资料。

项目定义

项目管理框架的第一个元素定义项目的范围和目标。它概述了项目内容的界限、商业案例和市场需求，解决商业案例所用的技术，以及项目的启动、销售和保证。

项目的范围不仅包括可提供的最终产品，还包括要完成这一项目所需努力程度。例如，一种用于减轻顽固性疼痛的新药，是一种注射剂，用现有的包装结构和特定的浓度和配方。这就是一个起始的大概的产品范围定义。项目范围非常费时而且过程形成复杂，还包括：

- 为完成项目在开发各阶段所要求的临床研究或实验的数量、类型和费用（包括患者的数量和地点）；
- 所需的配方、化学分析、包装、灭菌/微生物；
- 生产工艺，装备和生产产品所需的其他资源。

员工的时间、费用和资金等资源的预算（小时和美元）是根据这些资源大致的实时需求来计划的。这是项目批准文件或许可证的基础，此外还包括产品范围、项目目标、商业案例和财政评估。

项目目标也是项目定义的一个重要元素，设定了产品开发项目的目标。在需要协调的环境中运行这些目标，通常称为三重限制（图 1）。看着三重限制，会想到一些问题，例如：



图 1 新产品开发目标^[3]

• 你遇到过几个范围不变的项目？大概从未有过，即使遇到过，也非常少。

• 你有几次估计新项目所需最初资源的误差可以在 $\pm 5\%$ 之内？大概从未有过，即使遇到过，也非常少。

• 有多少次你被允许用完成一个项目所需的足够时间来完成这个项目？大概从未有过，而事实上，周期上的缩短是经常的。

根据已有的这些经验并假设这些经验是典型的，正确的，项目管理者认识到成功的挑战是巨大的，因为实现这些目标是成功标准。这强调了一句经常被项目管理者引用的老话是多么中肯，“快速、便宜、好，三者只能取二”。这是一句名言，它说明了项目管理中重要的困境。要解决这个困境，项目管理者必须理解赞助者和大股东的期望，并且在整个项目过程中能定期地与他们沟通。项目管理者要根据项目独特的不确定性和挑战性来给一个或多个预期定义为紧要的或次要的。在止痛药管理案例中，很可能特定的止痛水平是达到产品（产品性能）要求的关键。这是项目的范围和目标最有可能变化的内容。因为使产品快速上市是目标（上市时间），提供足够的资金（资源）支持这些目标是很重要的。所以目标中哪些是紧要的取决于经营股东的需要。基于对目标的认识，管理三重限制和经营预期需要用资金来开发和管理项目交易。

新产品项目的商业案例应该包括以下内容：

- 市场和消费者需求的评估，包括合适的市场研究；
- 竞争对手分析，包括他们潜在产品和强项及弱项；
- 组织能力的技术评价，这与产品的市场竞争力有关；
- 与组织商业战略一致的声明；
- 新产品财政机会的初步估计，包括投资回报、现金流贴现、内部收益率、净现值和损益平衡时间^[4]。

由于新产品估计的不确定性，财政分析工具考虑到风险和机会比决定论方法更合适且有价值。考虑到不确定因素的项目财政评估的新方法包括选择分析和蒙特卡罗（Monte Carlo）刺激。由于主动地处理了不确定因素，这些工具能更准确地计算新产品概念的风险和机会^[5]。采用财政分析模型，项目经理能够写出基本协定说明以帮助理解每个目标的重要性。在止痛药案例中，说明强调了时间的价值“项目拖延一周，今天就要多花费 100 万”^[6]。

当然，所有这些项目的定义过程和努力，有望导致一个批准的最终成功的新药品。根据新产品开发的特性，如不确定性、高成本、有限的资源等，强调需要项目销售和支持的同步程序。为了完成这个任务，新产品项目早期需要两种人：保证者和支持者。项目保证者是组织内部的项目支持者，他把项目卖给管理者。项目支持者是高级执行人，他给予项目资金和资源的支持。当然，买新产品时有更多的保证者，就会有更多的来自高级执行人的潜在资金支持。所需的支持水平和高级执行人数目将随着项目资金需求的增加而增加。这也许很明显，但是还没有被意识到，这样会导致漏掉一个关键的新产品概念。

在新产品生命周期的早期，未来是渺茫的，需要一种

方法不但可以使其通过严格的商业、技术和财政的评估，而且要让其吸收养分并发展成为合适的开发项目。一个组织应该有一个早期新产品程序：①为组织在公平竞争环境中研究评估的所有新的有价值的概念提供机会；②组织力量集中于几个关键项目上，使产品开发加快。这个概念在有些资料中称为“漏斗”^[2]（图 2），表明了成功启动项目定义的几个要素：

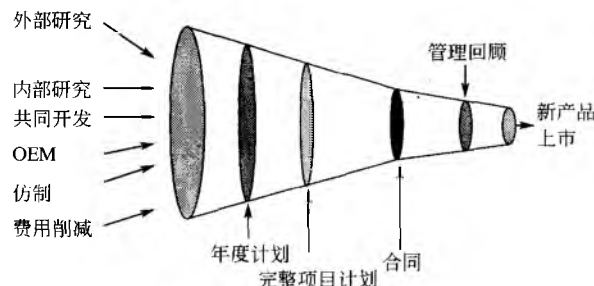


图 2 新产品的“漏斗”

- 积极主动地采集内外部的新产品概念；
- 研究资助新概念使其在评估之前达到合适的水平；
- 一个新产品概念评估程序，能保证商业案例按上述的标准，最好的概念可以得到足够的资金。

评估程序有时也被称为“阶段门”和“阶段回顾”，在开发项目的早期就要完成，也贯穿了整个项目的过程，在合同或整体项目计划中加以定义。在下文还会介绍项目计划及其在“阶段回顾”和“阶段门”中的应用。

项目团队和组织

团队是具有能力互补的少数人为了共同的愿望、目标和方法组织在一起，并能相互负责^[8]。团队并不适用于所有商业领域，但是面对新药开发，团队是最好的组织方法。

核心或主要团队和支持团队可以保持团队人员的精炼，如图 3 所示。核心队员代表组织中不同的功能，在组织中有明确的权力和责任（特别在优先的项目中），他们应具有专门的/技术的和一般的/商务的技能。在止痛药例子中，核心团队应包括这些成员：

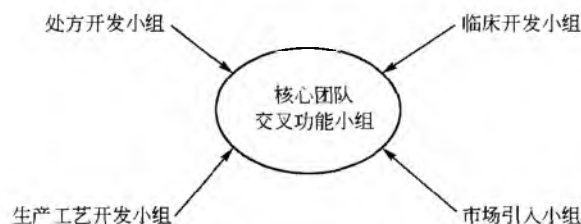


图 3 项目团队的设计

- 程序管理；
- 市场管理；
- 临床开发；
- 配方开发；

- 化学分析;
- 工艺开发;
- 操作管理;
- 法规管理。

这个例子符合团队严格的定义,成员数量少,但具有互补的能力并代表一个项目中几乎所有的功能。支持团队和支持团队成员将担任项目的主要工作。如图3中所示,这些支持团队的工作包括配方开发、临床研究、市场引入和生产工艺开发。

为了保持精炼和高效,核心团队应控制在12人左右。对于大型、急需项目,每个队员在他们相应的职能组织中都必须有相应的权力和责任。每个队员都要能:

- 确保项目的专业职能;
- 演示项目功能的前景;
- 保证达到功能目标;
- 主动给团队提出功能议案^[2]。

这些“重量级”队员有权自己决定和解决问题或利用合适的帮助来决定和解决问题。

每个队员都代表团队。“重量级”队员应该:

- 为团队的结果负责;
- 修订项目任务和内容;
- 确定项目情况报告和其他组织责任;
- 参与监督和提高团队的表现;
- 负责保证团队的效率;
- 从管理者的角度审查议案;
- 理解、认识并负责挑战项目和团队程序的界限^[2]。

队员必须意识到他们是团队的一部分。为了使团队特别多产且高效,队员必须与其他成员合作,把自己个人的或功能的议案放在一边,通过对话^[10,11]达成共识并为项目和组织创造最好的交叉功能方法。

这里用“重量级”这个词是为了指出队员具有重要的权力和责任。实质上,一个重量级团队应具有更多的决策和解决问题的权力和责任。如图4所示,高效的团队需要一个功能的或专家的观点,也需要项目的或整体的观点。根据项目的需要,功能的或项目的观点对项目的成功将起到更加重要的作用。例如,研究项目的成功更需要专业技术的观点而不是概括的观点,因此功能性的方式更合适,而且小的仿制药项目就不像大的专利药项目那样需要团队力量和概括性的观点。功能性观点对于“轻量级”团队更为重要,它们在功能内部做决定也许更合适。“重量级”团队应具有很强的团队导向作用的交叉功能的观点而不是单一的功能性观点。项目团队要更适合于一些专利药物项目,队员要从技术工作转为直接向项目领导汇报。在进入新商业或市场时应该创建这样的“重量级”团队^[12]。

领导一个“重量级”团队需要一个项目经理,他应在技术和宏观计划方面都具有重要的权力、责任和技能。一个“重量级”项目经理管理领导并评价核心团队的其他成员,决定核心概念,“动态”管理,是多种语言的翻译器(对于不同的语言均很流利),提供市场和顾客需求的直接

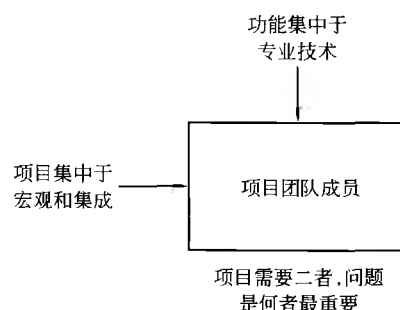


图4 项目组织结构

解释。这些人之所以能得到尊重和权力来扮演这个角色是基于他们以前的经验、娴熟的技术和超时工作的精神。一个能担当重量级项目经理的好领导是一个高效的重量级团队的先决条件^[2]。

要形成一个高效多产且有团队导向作用的结构,组织必须支持交叉型功能团队,并利用这些团队,使他们能高效地工作。对团队的支持需要正式认可团队将为新药开发和上市的方式。这也许听起来很简单,但是实际上需要新的方法:

- 表现评价——包括队员和整体结果的功能评价;
- 晋级和加薪——建立基于团队结果和团队成功开发新产品的激励机制;
- 职业发展——提供与重量级团队成员能力发展相关的职业梯度发展渠道。

任何有悖于这个核心的方法都会使团队环境处于非最佳状态^[13]。

项目计划、日程安排和控制

尽管项目管理早在20世纪50年代中期就开始应用了,但关键路径法和项目评估回顾技术(PERT)被认为是现代项目管理实践的开端。关键路径法是一种网络分析技术,用来预计项目所需时间,使其活动和途径具有最小的日程变化和浮动。关键路径法决定最短的项目完成时间^[1]。它取决于对任务所需时间的估计,而PERT要用到三个估计。关键路径法就像是最坏和最好的状态估计。实际上,PERT是一种计划和跟踪时间的非常麻烦的方法。

网络逻辑决定了任务和队员之间的关系,或是连续的(从结束到开始)或是重叠的[从开始到开始和(或)从结束到结束]。有很多廉价的软件包可以用来计算关键路径和浮动。然而,项目管理工具真正的挑战是在历史经验和团队的基础上生成项目网络。在医药领域项目的定义是独特的,每个项目都是不同的。所以,开发、跟踪、调整项目对于项目的成功应用是至关重要的。

团队成员组成项目网络的通用方法是“黄标签”法。该法用标贴、滚动纸、标记和团队来完成网络图。“黄标签”方法的步骤如下:

- (1) 项目团队跟踪管理目标完成日期的节点;

(2) 确定团队成员在节点日期前必须完成的任务和责任（这提供了任务的终结连接）；

(3) 创建网络图如下：

• 根据有用的信息而不是可用的资源确定哪个任务今天可以开始；

• 确定初始任务完成后哪个任务可以开始，此后可以完成哪个任务，依次类推，直至项目的终点或下一个大的节点。

(4) 最好第一次计划会议后就获得团队成员可交付成果的承诺；

(5) 项目节点日期和团队可交付成果日期的协调。

第二步采用项目管理中一个非常有价值的工具，即工作分解结构。工作分解结构是一个“组织和定义整个项目范围，以可交付成果为导向的项目元素集合”^[1]。在这个推荐给药物开发用的例子中，项目是在节点的第一阶段来组织的，这就是高级管理层者想在项目中看到的节点，如FDA申报、IND申报、生产出第一批库存、第一批临床供应生产等。按照节点，每个队员都有可交付的成果，即“任何能衡量、有目标、能证实的成果、结果或项目，这些都是完成一个项目或部分项目必须完成的”^[1]。队员可交付成果有：建立分析方法、开发产品配方、灭菌工艺、开发生产工艺质量、制定质量标准、生产临床试验样品，开展研究临床、准备规定的申报材料。详细的项目计划当然也要制订好，通常最好制订详细的计划，队员接受基本的可交付成果的职责，除非有两件事发生：

- 队员不理解工作；
- 队员不积极。

应该用标准操作规程处理第一个问题，用合适的队员处理第二个问题。制定更加详细的计划会使队员不积极（例如微观管理）和跟踪过于笨拙而详细的进度。

计划方法的第(1)~(3)步最好在有支持团队成员参加的核心会议上完成。(4)~(5)步最好在会后队员们有时间估计他们的工作量和承诺复杂的各交付成果之后完成。可交付成果日期和项目节点的谈判也最好在会后完成。应该给予项目队员这个过程状态的建议，但是项目经理必须和个别队员、部分项目团队和管理者、和（或）外部的股东一起完成。这一部分的过程如图5所示。如果管理者之间对重要的节点的完成期望不一致，有很多选择：

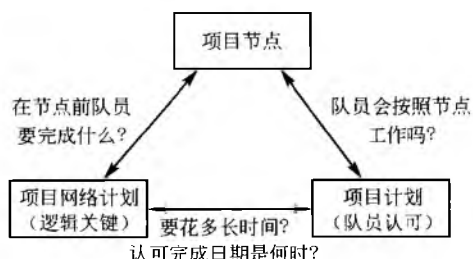


图5 基于团队的项目计划和进度方式

- 改变节点日期；

- 快速跟进项目进度；
- 项目赶工。

改变节点日期是最直接的方法。重订目标日期是因为团队一起来制订进度时证明原先的假定日期不正确。“快速跟进”项目意味着把原来应按次序完成的任务齐头并进。这需要冒险，并应加以证实。项目赶工时在分析多种可行性，决定如何花费最少而得到最大的工期压缩之后减少整个的工期。赶工通常是用增加资源来减少时间。增加的资源有时也不能有效地减少时间，因为增加的资源与技术或部分团队程序不是很相关，或者一个特殊的任务需要一段时间来完成。

项目计划的结果和进程的程序都应有计划文件，即所谓项目或集成综合项目计划。用于强调它代表所有成员的总体计划。一个综合项目计划应该包括以下信息：

- 项目的范围和目标；
- 商业案例和财政分析及项目模型；
- 项目风险和意外事件计划；
- 项目计划和进程（用来管理回顾的节点和面向队员的详细的队员可交付成果形式）；
- 队员的角色和责任（工作分解结构联系项目节点是最好的表达形式）；
- 功能的和技术的战略（如注册战略、计划和挑战）；
- 表现的评价和激励。

这是为了说明目的的一个例子，项目经理和团队应该根据需要拟定他们自己的形式和大纲。

管理的唯一致命的弱点是时间和资源的评估，在大多数情况下其实是错误的。唯一的问题是评估中不正确的程度。其实并没有真正科学的评估方法，类似的预测也没有科学的方法，现在所用的评估方法更像艺术和“感觉”而不是科学。因而，由于项目评估的不确定，最好依据两个数据工作：最合适的数字和最大的数字（图6）。新的项目管理方法（与PERT相反，如“关键链”项目管理）可以根据不确定因素来制订进度。

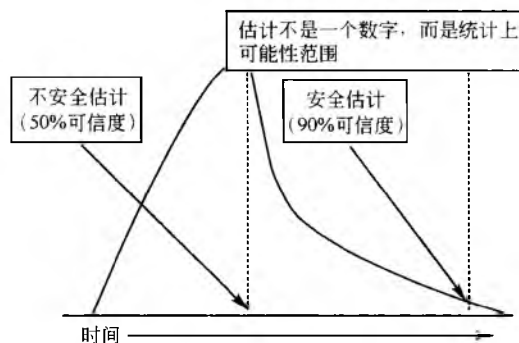


图6 时间和资源估计：项目管理的致命弱点

当项目进度表制定好之后，就用来跟踪和回顾项目进程直至完成整个项目，一些基本概念如下：

- 与队员开始项目控制；
- 队员需要有他们任务的归属感，部分归属感是随时

沟通的状态；

• 医药开发项目需要项目回顾的分层结构，核心和支持团队应每周一次或更频繁地总结工作。管理者和其他股东参与项目总结有利于形成对项目状态的共同认识。

以上每个元素将在以下文的沟通计划中再涉及。

用模型解决问题和做出决定

药物开发项目包括阶段、技术转让过程、节点和解决问题周期。整体上或更具体地理解药物开发项目基本构成

模块对理解项目过程、结构以及过程状态和沟通都是重要的。例如：

- 医药开发项目的临床开发阶段：I、II、III、IV期和上市后；
- 从研究到开发、从开发到生产的技术转移；
- 药物项目大的节点：FDA申报和第一批库存；
- 使用不同的产品模型周期和它们对于解决问题、沟通结果和制造过程的价值。

一个药物开发生命周期的例子如图7所示。

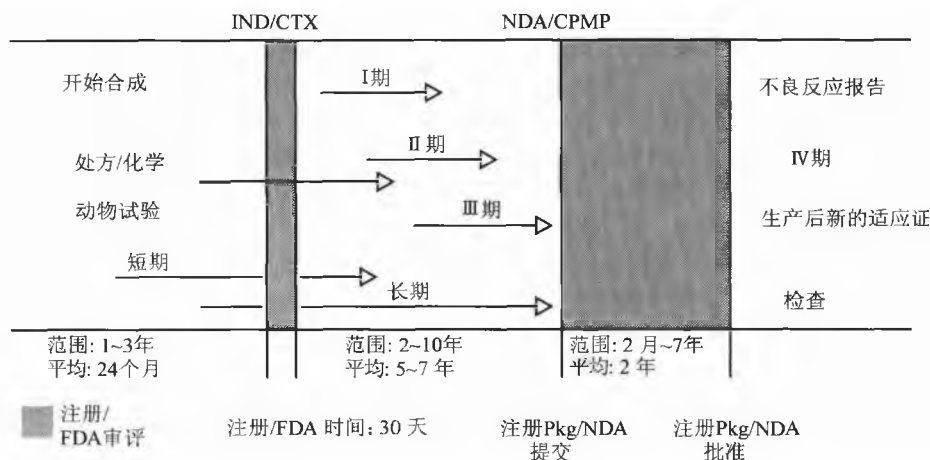


图7 药物开发阶段

从一个组织到另一个组织的技术转移是项目的重要阶段，如图8所示，技术转让有两种方法：

- 传统的、连续的方法；
- 重叠的、并进的方法。

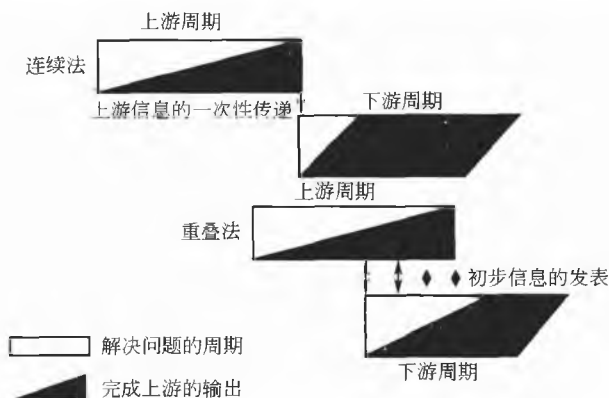


图8 交叉的功能集成需要重叠地解决问题^[9]

连续方法通常被称为“扔过墙方法”，在这种方法中上游组（如开发组）完成产品开发并建立了新产品的质量标后与下游组（如生产组）沟通这些信息。传统上，这种方法很流行，因为这种方法感觉上很高效，没有在未完成的研发工作中浪费时间。然而，在很多情况下，这种方法造成了很多返工，不能高效地利用时间。

实际上，重叠方法是更有效的方法，真正能达到技术的整体转让。在这种方法中，上游组和下游组一起理解、解决在技术转移中需要重新解决的问题。这些问题举例如下：

- 建立、转移分析方法；
- 建立、转移解决过程；
- 开发产品包装；
- 开发灭菌步骤和方法。

在重叠法中，上游和下游的队员在一起完成这些任务，解决问题，做出必要的决定。这要求下游团队较早地积极参与，甚至在过程还未开始之前就参与。这也要求与上游团队一起分享还不完整的、不确切的信息。分享这些信息对下游的反应会有不确定的风险，这个方法需要两个团队之间的合作和信任，这是成功的产品开发和成功的团队的两个基本元素^[2]。

另一个基本的产品开发项目的构成结构是设计-建造-试验循环。这个循环用实验模型作为解决问题、试验、沟通和冲突解决方案的焦点。用这些循环提供目前所做决定的反馈，及发现需要重新解决的问题。临床开发项目的循环实验模型的例子如下：

- 确定原料药的供应商；
- 确定配方的可行性；
- 完成工程运转；
- 生产临床的和（或）稳定的样品；
- 启动生产程序；

• 生产第一批库存产品准备销售。

这些例子是为了说明设计-建造-试验过程循环的重要性。每个项目循环都不一样。完成每个循环是跟踪和论证项目过程的非常有效的方法。模型可以给项目目前的进展、完成项目所需的余下的任务及提供非常集中的沟通。

高级管理层回顾和控制

高级管理层给新产品团队为之工作的药物开发项目提供了支持、保证及资金，他们需要参与并了解项目的重要性、项目与商业战略和成长的联系、项目面对的风险和问题，以及项目的现状。这种了解在整个项目过程中尤其是开始的时候很重要，如图9所示，在项目开始的时候有更多的机会有效地影响项目的方向和规模。但是随着项目的进展，影响项目的方向和规模就困难，且花费更多。通常当项目接近投资回报时高级管理层的介入会增加，这通常在项目生命周期的后期，主要源于项目销售和市场活动的日益增强。

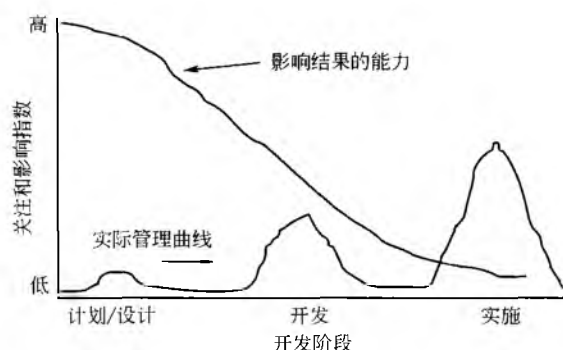


图9 在确定项目方向时得到高级管理层的介入^[15]

高级管理层在项目开始时的介入是项目成功的关键，一些保证管理介入过程的指南如下：

- (1) 高级管理层应该制订指导新产品开发的战略方向；
- (2) 高级管理层应建立新产品项目的档案柜，收集能实现战略目标的项目；
- (3) 高级管理层应积极地参与项目团队类型的指定（见前文）和项目类型的指定，例如这个项目应该放入哪个档案柜；
- (4) 高级管理层应发展和支持项目审核程序，以鼓励早期参与项目来验证商业假设和降低项目风险^[12]。

药物开发项目的管理应该积极主动地推动这些过程元素以保证高级管理层积极地早日参与他们的项目，项目必须有正确的支持和清晰度。另外，这些机制有利于项目及时地适当地终止。

高级管理层的项目审核是新产品过程的关键元素。项目经理应该具备与高级管理层直接沟通的能力。如前所述，审核的层次结构对于保证及时连续地沟通项目状态和问题是重要的，同样，“阶段门”审核是一种很常用的方法，用来澄清项目定义、评估商业案例和技术问题。高级管理层

应该参与这些审核以保证项目朝既定的目标发展，并全面达到新产品开发的目标。高级管理层审核应该评估：

- 项目的商业问题和目标；
- 与市场及消费者需求相关的问题；
- 资源管理；
- 公司和商业部门方向以及适合的生产线；
- 销售和回馈的预期；
- 项目进度；
- 及时引入市场；
- 技术满足质量和成本目标的可用性和成熟程度。

审核可以定期地进行（例如，一个阶段完成之后或完成阶段的四分之一后），或根据高级管理层和项目团队需求来定。这个时间表是根据组织的需要和项目的特点来定的，审核可以是强制的（即项目只有审核之后才可以继续）或灵活的，这取决于组织的需求和项目的特点。在所有情况下都必须用审核来决定是否继续项目（例如做出继续或不继续的决定）。范围变化的定义见下文。

积极地、实时地调整管理

如前所述，在药物开发项目中范围变化是预期会发生的。唯一的问题是范围变化的数量和程度。因此，项目需要一个控制范围变化的程序。对所有项目统一的命令式的集中控制或许太简单了，还可能导致不必要的官僚作风——有可能会影响到项目成功的能力。项目团队需要自我调整，管理范围依据每个项目独特的需要调整，并且应有保证适当的过程控制和管理审核的规则。

管理范围变化需要积极地实行项目范围变化程序，这包括识别和管理项目风险。建议的管理范围变化程序有如下内容：

- (1) 说明真正的问题——为什么需要改变范围？建议给范围变化分类以便于决定相对必要和重要的内容。同样，这也许会导致过度地杀伤。
- (2) 收集相关事实——假如实施范围变化会造成怎样的后果？对上市时间的影响和开发及最终产品的影响怎样？如果不实行范围变化会怎样？这些事实应该从合适的人那里得到（即受到范围变化影响的股东）。
- (3) 研究几种可选方案——不需要做任何事吗？按要求执行总体范围变化？有没有折中方案？哪个股东对哪个方案感兴趣，他们的预期是什么？
- (4) 分析和审核替代方案的影响——对每个替代方案的上市时间、投资成本、生产成本的影响是什么？财政分析是这一步的关键元素，因为高级管理层用财政当作关键的商业指标。所以，每个替代方案都需要对照财政模型来分析评价。每个替代方案的风险和益处是什么？
- (5) 采纳可变方案——这与高级管理层审核过程相关。对于主要的范围变化，项目经理应该提供主要的解决方法的分析，在财政分析和质量因素的基础上，项目经理应该将项目团队的建议提呈给主要股东和高级管理层以得到他



们的同意支持。

(6) 告诉每个人——显而易见，项目团队必须被告知范围的变化，因为这样他们才能执行计划。项目股东同样必须被告知，以便可以用合适的资源支持项目变化。

(7) 审查结果——这一步骤是被轻视的。项目的成败通常与执行范围改变的好坏有关。从引发范围变化的事中和这些变化对项目的成功有好的或坏的影响中有很多经验可以吸取^[17]。

如前所述，范围变化的财政分析和可选方案的研究是成功地实行范围变化的重要步骤。项目经理必须提供给高级管理层这些信息，以便他们能理解对商业的财政影响。一种建议的方法如图 10 所示；这种方法要求项目经理应用财政模型于项目中（每个项目都有）并理解：

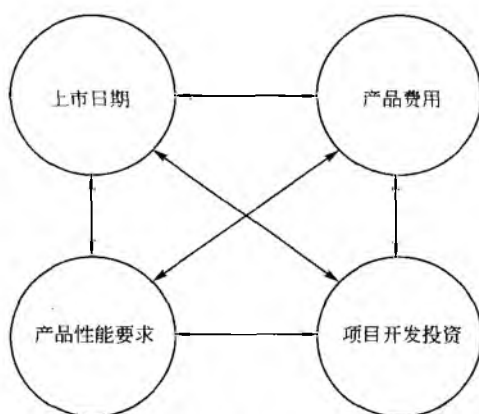


图 10 范围变化正确性的财政评估^[16]

- 延迟或缩短时间的成本/利益；
- 增加或减少产品成本和（或）项目投资的财政影响；
- 改进产品用途、适应证、功能或特性的好处。

理清范围变化与这些变量的关系是重要的第一步，例如，项目延迟一周要花费 500 美元公司保证金。第二步是理解范围变化对每一个变量具体的影响，例如，增加一项产品用途和适应证会延迟 3 个月（有 50% 可能），多花费 500 万美元来完成，而且导致产品的整个生命周期增加 5000 万美元的公司保证金。这值不值得投资？当然，一些无法预知的因素也要考虑。

“粗笔触”型财政分析方法是做出使项目目标和范围变化达到平衡的决定的基础^[6]。已知药物开发具有巨大的不确定性和复杂性，在这种环境下，范围变化更需要更复杂的分析方法（如 Monte Carlo 刺激、选项分析等）。这些超出了本章的内容，请读者参阅本章前面相应部分列出的参考文献。

药物开发项目中确实存在不确定因素，项目的不确定因素可以体现在以下几方面：

- 市场和竞争对手：有没有其他公司的新药和适应证将进入相同的市场，将造成怎样的影响？
- 技术的成熟度：我们的医药技术是否可以解决消费者的问题或至少可以生产出更好的产品？消费者是否会理

解并应用这些技术？

• 法规和政府的环境：管理部门和政府机构是否会修改法规？假如会，是否会影响项目的基本假设？对产品开发、批准和上市有没有影响？

• 提供原料、独特的物品和服务：能否给项目提供这些？这些风险是否与他们的技术、能力或政策环境有关？

• 项目内部风险（例如资金、进度、团队成员）：团队成员是否能够完成他们的任务？资金是否够支持项目？进度能否保证？

这是风险的总体分类归纳，并没有包含所有的情况。项目经理应该以这些分类为起点，补充更详细的内容，制订更加完善的蓝图。

风险识别是风险管理程序的第一步。识别风险之后，项目团队需要在两方面评价风险：①发生的可能性；②财政的影响。在这个过程中常用的方法是风险矩阵，如图 11 所示。这个矩阵可用来识别最重要的风险——那些需要意外计划的情况。最重要的风险应该落在Ⅳ区，发生的可能性大，财政的影响大。如下例中矩阵所示：高和低之间的界限不是量化的，而是根据项目团队的输入来定的。第Ⅱ、Ⅲ区的风险需要进一步观察以决定是否情况有很大的变化，需要批准一个意外计划，即使一开始并没有这种计划。

		发生的可能性	
		低	高
财政的影响	高	Ⅱ区 可能性低 影响大 无应急计划 监视	Ⅳ区 可能性大 影响大 设定应急计划 计划
	低	Ⅰ区 可能性低 影响小 无应急计划	Ⅲ区 可能性大 影响小 无应急计划 监视

图 11 风险管理计划

在新产品项目管理中的风险管理的基本概念如下所示：

(1) 风险识别、量化，全部核心队员都参与制订应急计划。

(2) 并不是每个风险都要实行应急计划，但识别风险时通常会建议一个应急计划，这有利于鼓励积极主动的方法。

(3) 风险管理是个动态过程，不能完成也不能忽视。很多项目经理都认识到了这个困难，不断地观察风险，尤其是在Ⅱ、Ⅲ区的风险。

(4) 总之，由项目不确定引发的风险是潜在的最具破坏性的，可以影响项目的范围变化，项目经理和团队最好通过风险管理程序来主动地管理项目范围的变化。

结论

40 多年前发展起来的传统的项目管理方法论（即建筑

工业用的)已经演变成管理新产品开发的一种方法。这是一种更为灵活的应用方法,可以更为灵活地应用于分散的团队导向的环境中——一种进行成功开发药物新产品的环境。项目管理在制药领域中扮演着一种团队的重要角色,整合不同功能的方法,提供项目总体的观点来平衡多种科学的、技术的观点。未来成功的项目管理者将具有总体的定位能力,把使团队更为有效及交叉整合功能作为最优先考虑的事,争取克服破坏中心原则的障碍。

仅仅理解概念或应用一些项目管理工具是远远不够的。为了达到最佳的结果,组织者应该认识到项目管理的重要性并全力支持项目经理。通常组织不是完全把项目交付给经理,而是选择中间的或暂时的方法,例如双重项目领导——一个项目有两个领导,一个技术领导,一个项目经理。另一种相似的策略就是“双帽子”项目经理——即项目经理还有第二个角色即功能的或技术的经理。这需要被另一种方法代替,即项目经理独立地扮演这个角色,项目经理必须有足够的技能、知识和能力来完成整个项目。这不是一个容易的方法,但是组织会发现正确的方法往往不是容易的方法^[18]。

参考文献

1. Project Management Institute (PMI) Standards Committee. Project Management Body of Knowledge; PMI, 1995.
2. Wheelwright, S. C.; Clark, K. B. Revolutionizing Product Development; Free Press; New York, 1992.
3. Reinertsen, D. G. Managing the Design Factory; Free Press; New York, 1997.
4. House, C.; Price, R. The Return Map; Tracking Product Teams. Harvard Bus. Rev. 1991, Jan/Feb.
5. Amram, M.; Kulatilaka, N. Real Options; Harvard Business School Press; 1999.
6. Smith, Preston; Reinertsen, Donald. Developing Products in Half the Time; Van Nostrand Reinhold; New York, 1998.
7. Cooper, R. G. Winning at New Products; Addison-Wesley; Reading, MA, 1993.
8. Katzenbach, J. R.; Smith, D. K. The Wisdom of Teams; Harper Business, 1994.
9. Hayes, R. H.; Wheelwright, S. C.; Clark, K. B. Dynamic Manufacturing; Free Press; New York, 1988.
10. Issacs, W. Dialogue, The Art of Thinking Together; Currency Doubleday, 1999.
11. Senge, Peter. The Fifth Discipline; Currency Doubleday, 1990.
12. Wheelwright, S. C.; Clark, Kim B. Leading Product Development; Free Press; New York, 1994.
13. Holahan, P.; Markham, S. Factors Affecting Multifunctional Team Effectiveness. The PDMA Handbook of Product Development; Rosenau, M. D., Jr., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.; New York, 1996.
14. Newbold, Robert C. Project Management in the Fast Lane; APICS Series on Constraints Management. The St. Lucie Press, 1998.
15. Gluck, F. W.; Foster, R. N. Managing Technological Change; A Box of Cigars for Brad. Harvard Bus. Rev. 1985, 141, Sept-Oct.
16. Smith, P.; Reinertsen, D. G. Developing Products in Half the Time; VNR; New York, 1998.
17. Rosenau, M. Successful Project Management; John Wiley & Sons, Inc.; New York, 1998.
18. Bowen, H. K.; Clark, K. B.; Holloway, C. A.; Wheelwright, S. C. Make Projects the School for Leaders. Harvard Bus. Rev. 1994, Sept/Oct.

(杜敏琼 译)



X

血液替代品：碳氟化合物途径

Jean G. Riess^①

University of California at San Diego, San Diego, California, U. S. A.

引言

氟碳化合物乳剂提供了一种安全的、低成本的且不依赖于人或动物血液采集的被动体内携氧途径。全氟碳(PFC, 也称为氟碳化合物和全氟化学品)为惰性物质,不与氧、一氧化碳、二氧化碳及一氧化氮结合反应,但对这些气体的溶解度很大。PFC以亚微乳的形式给药,所用乳化剂同制备营养性注射脂肪乳剂的乳化剂相同,均为蛋黄卵磷脂(EYP),这使得PFC乳剂有一定的相似性。PFC携氧是通过高效和快速萃取实现的,从而使氧含量与氧分压成比例的增加,在稀释血液时,PFC携氧增加心输出量,引起与氧含量有关的氧耗增加。Ⅲ期临床试验证实手术时,作为急性扩充血容量正常的血液稀释步骤的一部分,该乳剂可以缓解并减轻接触输入血,这也是血液替代品的潜在用途之一。因此PFC有提高携氧量、增大患者安全性和缓解血液短缺的能力。

本章将从开发血液替代品的必要性和PFC乳剂携氧的基本原理开始,继而集中讨论开发该类乳剂所遇到的一些挑战,即如何选择合适的可排泄PFC,如何制备一种稳定的、生物相容的乳剂;也将顺带涉及原材料的获取、生产制造和花费等问题;然后将关注这些氧载体的药物代谢动力学、疗效和副作用;最后将讨论这些产品的应用潜力,包括临床试验情况及展望。

目的——为何采用血液替代品

1. 库血的相关事宜

尽管公众没有意识到,但现在发达国家的供血已比过去安全了许多^[1~3]。然而输血伴随的风险远远没有消除,同时输血有免疫抑制作用,储存一段时间的红细胞(RBC)的直接效用降低。新的法律问题也引起了人们的关注,尤其是测试程度方面的问题^[4]。另外,血液短缺已成为全世界各地区长期存在的问题。

1.1 安全性

AIDS悲剧发生后,人们对输血的安全性焦虑万分。但AIDS只是通过血液传染的众多疾病之一。接收输血者感染肝炎要比AIDS普遍得多。细菌污染造成的败血症性休克尽管很少发生,但在一定的地区存在^[2]。疟疾和锥虫病在

一些地区很普遍^[5]。还有其他一些不明的感染因素也可能出现。最近出现的人克罗伊茨费尔特-雅各布病(cruetzfeldt-jakob disease)的一个新变种(nvCJD)引起人们广泛地关注,它和疯牛病非常相似^[6,7]。人们仍在讨论这种脑病是否会通过输血传染^[8,9]。

输血常常会引发轻度的过敏反应;严重的会发生溶血、急性呼吸窘迫综合征甚至出现致命的急性溶血反应(虽然很少发生,但确实存在)^[2,3]。另外,操作错误仍是输血发病和死亡的主要原因之一。

越来越多的证据证实输入外源血会降低机体的免疫力^[11,12],从而使输血受者患传染并发症和败血症^[10~12]。输入自身血的患者感染的概率要小于输入外源血的患者^[13,14]。患败血症患者的死亡率与输入的RBC的保存时间有关^[13]。手术进行中输血往往会引起炎症反应增强,炎症介质浓度增加,且接受心脏手术的患者术后死亡率增加^[16]。已经证实输血是肿瘤患者发生损伤后多器官衰竭的危险因素^[17]。

输血还会增加部分癌症复发和扩散的风险^[10,18,19],缩短术后的存活年限^[20]。当采用自体血而不是异体血时,这些风险将会减少^[21]。

不管每单位血所带来风险是多少,其风险都会随着输入血单位的增加而累加。相反,节省的每一单位血会减少与输血有关的副作用。

1.2 功效

冻存RBC会导致所谓的储存损害,包括血红蛋白对O₂结合力下降、pH降低、溶血、RBC可变形性改变、小颗粒凝聚物的形成、血管活性物质的释放以及蛋白质变性^[22]。储存2周后,仅有少数的2,3-DPG(可协助O₂向组织释放的异构因子)残留,因此输入储存血不能起到立刻提高携氧的效果。事实上使库血RBC的2,3-DPG水平恢复到正常水平的一半需要24h。和新鲜的RBC不同,储存28d的RBC不能改善血液高度稀释大鼠组织的氧合情况^[23]。于是提出了一个新的重要警告:储存血(包括预先捐献的自身血)不能等同于新鲜血。

1.3 可获得性

在发达国家,伴随着人口老龄化、新的先进治疗方法的出现,以及进行选择外科手术的的患者日益增多,发达国家的血液采集走上了下坡路^[3]。血液短缺问题越来越突

① 作者是美国圣地亚哥Alliance制药公司董事会成员,但本章中的观点为他本人的观点,不一定是他公司的观点。



出,以致许多选择性外科手术被迫推迟。人们预计将来对血液的需求将增加,而献血量却会减少^[22,24,25]。任何附加的改善安全性的措施都将使献血过程推迟,从而直接影响血液的可获得性。如果安全性的提高是以减少可获得的血液为代价,那么人们最终将死于缺血。

在新兴国家,血液长期短缺是由合适的或自愿献血的人数有限引起的。病毒或寄生虫污染使得大量已采集的血液被废弃。另外,有时还缺少采血、储血和运输血所需的设施以及技能培训。

2. 期望通过血液替代品获得什么

正在开发的产品不是血液替代品;它们只是实现 O₂/CO₂ 交换功能,且持续时间较短。它们不承担血液中的任何调控、防御和凝固功能。但是有效的氧载体在手术过程中仍是非常宝贵的。另外,在血液不能发挥功能的情况下,它们能确保组织的氧供。

有效的氧载体在血液流经肺部时能迅速载氧,到达有局部缺血风险的组织时,能迅速且大量地释氧。它们必须不含细菌和病原体,不刺激病原体形成。它们不能引起抗原反应,且副反应在临床上应该最小化。除携氧外不能有其他生理活性。还有一点也很重要:它们能保持血液稀释后通常的心输出量的增加。理想的情况下,它们应有较长的循环时间。使用氧载体时,应减少书面错误并降低输血不相容性的风险。产品应该易于使用、方便处理且见效迅速。产品必须从安全的原材料大规模生产,最好使用热法灭菌且在通常条件下储存时能长期稳定,且成本低。

现有的氧载体,不管是 PFC 还是 Hb,在使用时都必须考虑到,它们在循环中的半衰期都比较短。这种缺陷并不会限制其在手术中的应用(该情况占据了采集血液的 60%),反而可能降低或避免与外源血的接触。当发生紧急情况或需要使用储存 RBC 以提高携氧能力时,人造氧载体可以作为桥梁向组织供氧。不依赖于血液的血液替代品将在解决血液短缺问题中起着不可忽视的作用。与适当的手术步骤相结合,血液替代品可以帮助患者实现自体献血。对于发展中国家来说,血液替代品将会满足未来医护的

需要。

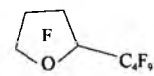
站在管理当局的立场评价注射用氧载体的一个困难是缺少比较的标准。从来没有就血液和 RBC 的功效进行过临床对照试验,管理当局也没有正式批准过使用血液和 RBC^[26,27]。包括手术前献血和血容量正常的血液稀释在内的自身输血的情况也是如此。已经有许多努力致力于确定一种适当的临床终点,凭此确定氧载体是否能带来临床效益。现在看来,在手术中避免输入外源血就是这样的一个终点。

PFC 携氧的基本原理^[26]


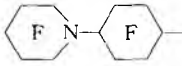
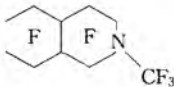
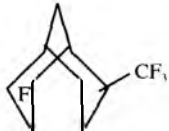
1. 稳定和被动的气体溶剂

不同于大多数有机化合物,PFC 由碳和氟组成,而不是碳和氢。其载氧是因为氧气在生物相容的液体中的溶解,而不是像血红蛋白那样通过与氧化学结合而载氧。之所以选择 PFC 进行体内携氧,是因为 PFC 融合了两种独特的性质:PFC 对气体的溶解度高(在所有液体中最高)和异乎寻常的化学和生物学惰性(在迄今为止发明的有机化合物中,它们最稳定)。第一种性质是液态 PFC 较弱的分子间作用力(范德华力)的直接结果,易于使气体分子溶入其中。另外,PFC 的惰性反映了分子间共价键较强、氟原子电离电势高和极性弱。C—F 键是有机化学中最强的单键,全氟烷基链(F-alkyl;F 前缀表示结构中所有的氢原子都被氟原子取代)和氧、氮、氯或溴之间的键的强度增加。氟原子的电子密度较高,形成了压缩、相斥的电场,从而对分子骨架实施了有效的防护。PFC 在与携治疗作用的氧相关的加工、保存和使用中不易氧化和发生反应。单纯的 PFC 耐 300℃ 高温,其乳剂可在 121℃ 条件下高温灭菌。已知没有酶能消化 PFC,也没有任何微生物以它为食。PFC 和磷脂一样高度疏水,这使其生物相容性较好,并在很大程度上决定了它们的排泄速率。表 1 列出了以开发可注射氧载体为目的而研究得较全面的一些 PFC。

表 1 为开发注射用氧载体而研究得较为透彻的全氟碳¹⁾

结构式	代码(M _w)	制备方法(纯度)	沸点/℃	蒸气压(37℃) /Torr ²⁾	O ₂ 和CO ₂ 的溶解度 (v/v, 37℃)/%	网状内皮系 统半衰期/d
CF ₃ (CF ₂) ₇ Br	1	全氟碳 PFOB (499) 调聚反应 (>99%)	143	11	50 和 120	~4
CF ₃ (CF ₂) ₉ Br	2	PFDB (599)	180	1.5		20~25
CF ₃ (CF ₂) ₃ CH=CH (CF ₂) ₃ CF ₃	3	F-44E (464)	—	12.5	50 和 247	~7
	4	FX-80	~103	58	52 和 190	
N[(CF ₂) ₃ CF ₃] ₃	5	FTBA	178	1.1	38 和 140	>500
		(80%~85%)				

续表

结构式	代码(M_w)	制备方法 (纯度)	沸点/℃	蒸气压 (37℃) /Torr ²⁾	O ₂ 和 CO ₂ 的溶解度 (v/v, 37℃) /%	网状内皮系 统半衰期/d
	6 FDC (462)	CoF ₃ (~97%, 顺式和反式)	142	12.5	42 和 142	~7
$N[(CF_2)_2CF_3]_3$	7 FTPA (521)	电化学氟化 (>95%)	131	18	45 和 166	~65
	8 FMCP (596)	电化学氟化 (~55%)	168	2	40	~90
$Cl(CF_2)_8Cl$	9 PFDCO (471)	电化学氟化	155	6	43	~7
	10 FMIQ (495)	电化学氟化 (~95%)	153~ 154		42	~11
	11 FDN (512)	CoF ₃ (50%~ 55%)	157	6	40	~14

1) 环中的 F 表示环上所有的碳原子均被氟化。

2) 1Torr=1.333 22×10²Pa, 下同。

PFC 中的溶氧量遵循 Henry 法则, 即 PFC 中的溶氧量和氧分压成正比 (图 1)。因为不含化学键, 所以不存在饱和的问题。PFC 摄取和吸收氧基本不受温度 and 环境影响。可以简单地通过控制 O₂ 的压力来调节氧含量。在一个大气压下且血管内使用时, O₂ 在 PFC 中的溶解度从 40% 到 50% (v/v) 不等 (表 1); 即比在水中的溶解度大 20 倍或更多^[28]。线形 PFC 较环形或多聚环形的有优势^[29]。CO₂ 的溶解度从 140%~240% (v/v) 不等。

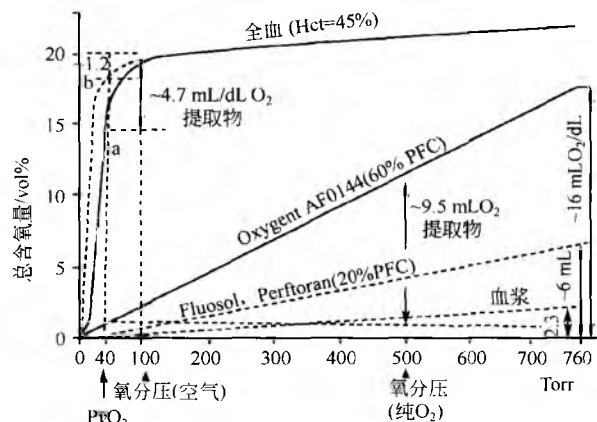


图 1 氟碳乳剂 Oxygen AF0144、Fluosol、Perftoran 中的氧含量与新鲜 (a) 和储存 (b) 血及血浆中的氧含量与氧分压关系的比较

2. 纯化合成载体

生产 PFC 有两种路线, 包括用氟替代 PFC 碳氢类似物

中的氢, 或将已经氟化的反应活性的结构模块加以组合以形成目标 PFC^[30]。HF 的电化学氟化作用、高价金属氟化物 (三氟化钴) 的氟化作用, 以及用氟元素直接氟化属于第一类, 而四氟乙烯 (TFE) 的调聚反应属于第二类。因为 C—F 键能量高于 C—H, 所以用氟取代氢后将释放出许多能量, 并经常产生复杂的混合物。但有几种通过取代法生产的 PFC 已经用于开发氧载体 (表 1 和表 2)。另外, 调聚反应易于生产出较纯的线性 PFC。调聚反应是反应终止剂 (如 C₂F₆I) 和烯烃 (如 TFE) 反应生成一系列较长的调聚物, 即 PFC 产物, 产率很高。TFE 调聚反应得到的 PFC 包括氟代溴辛烷 1 (PFOB)、氟代溴癸烷 2 (PFDB), 这些物质是 Alliance 制药公司刚刚开发的乳剂 Oxygent™ AF0144 的携氧成分, 而 Neuron 治疗公司利用 1, 2-双氟丁基乙烯 3 (代码为 F-44E) 开发治疗脑卒中的乳剂^[31]。

3. 注射用乳剂

因为 PFC 不溶于水, 所以将其制成乳剂注射使用。获得稳定、生物相容、粒径较小、分布范围较窄的可排泄型乳剂非常关键。但是因为 PFC 高度疏水, 使得制备稳定的乳剂非常困难。PFC 研发阶段的重要事宜包括乳剂处方、物理和生物性质、放大、消毒、包装以及用户友善性和使用方法。

PFC 亚微粒外面包裹的一层表面活性剂充当乳化剂和乳化稳定剂。已经研究了一系列浓度为 20%~100% (w/v) (11%~52%, v/v)^[31~34] 的乳化剂。目前使用 EYP 为乳化剂。因此这些乳剂同静脉内用脂肪乳剂英脱利匹特® 非常相似。乳剂的渗透压与 PFC 浓度无关, 随盐或其他张



度剂浓度的改变而改变。与较大的微粒相比，粒径小于 0.2 μm 的颗粒不易被吞噬，因此在血管中的停留时间较长，且副作用较少。不同于 Hb 溶液，PFC 微滴通常不容易滤出循环系统。

4. 温和的携氧能力转化为高效的释氧能力

向循环系统中引入 PFC 乳剂相当于提高了血浆的溶氧能力。PFC 运输氧的原理和血浆基本上是一样的。两种情况下溶解度都同氧分压成正比，而 PFC 溶解氧的能力至少是血浆的 20 倍^[28]。特定 PFC 中溶解氧的总量是由溶氧系数、乳化剂浓度和氧分压共同决定的（图 1）。例如，37℃ 时在 60%（v/v）的 PFOB 乳剂中，室内空气下溶氧量为约 3%（v/v），而纯氧条件下为 16%（v/v）。吸纯氧患者的动脉血氧压可以增至 500Torr，乳剂将携 10.5%（v/v）的氧。

PFC 向组织释氧不依赖于分子构象的改变或其他协同作用，也不需要变构效应因子的协助。因为 O₂ 和 PFC 分子之间的范德华力比 O₂-Fe（II）共价配位键要弱一个数量级，所以萃取率和萃取速度提高很多，这比血红蛋白释氧的原理要简单易行得多。PFC 乳剂的萃取率可达 90%，而正常条件下血红蛋白的萃取率仅为 25%^[35,36]。上面提到的氟代溴辛烷乳剂中 O₂ 的体积百分数总计为 9.5%。在任何生理有关的分压下，PFC 都可以有效释氧，这使协同效应成为非必需的。同样 PFC 释氧不受 pH 影响，同时不受温度可逆的调控。因为 PFC 不易氧化且不易发生其余的修饰反应，所以它的携氧和释氧性质并不受储存影响。当循环中同时出现 PFC 和血红蛋白时，PFC 将首先释放其所携带的氧，从而使氧气和血红蛋白结合而储氧。

在地球大气中血红蛋白非常适于支持生命，但在手术室和危症监护病房情况则不同。根据 Henry 法则，提高患者吸入空气的氧浓度（FiO₂）可以 5 倍地提高 PFC 运输氧的能力。

不能单纯就与空气中氧结合的能力及溶氧量来对血红蛋白溶液和 PFC 乳剂进行比较。因为这样就会忽视正常情

况下 PFC 高达 4 倍的组织氧萃取率，并对用纯氧替代空气供患者呼吸可 5 倍的增长 PFC 中的氧容量这个可能性视而不见，即忽视 PFC 产品使用的实际条件。

最后决定其效果的是输向组织的 O₂ 数量和载体对组织氧耗 VO₂ 的贡献。携氧量、DO₂（一定时间内向组织的供氧量）是由动脉血液氧含量 CaO₂ 和心脏输出量 CO 共同决定的 [方程（1）]：

$$DO_2 = (CaO_2) \times CO \tag{1}$$

在血容量正常的情况下进行血液稀释可以增加血液的流动性，从而大幅提高心脏的血液输出量^[37~39]。使用 PFC 乳剂可以维持心脏输出量的提高，这进一步增强了它们的携氧能力^[39,40]，而脱离细胞的血红蛋白则由于收缩血管作用，使得心输出量保持不变或减少，这就抵消了血液流动性增加带来的好处^[41,42]。

使用 PFC 吸入氧浓度（FiO₂）较高的场所，较大的氧分压梯度是 PFC 液滴向组织释氧强大的驱动力。乳剂小液滴通常尺寸为 0.1~0.2 μm ，即 RBC 粒径大小的 1/30~1/70，因而容易在毛细血管床循环。当患者患急性贫血或者进行血液稀释时，血浆间隙可以达到很大。PFC 将大量出现在微循环红细胞的血浆间隙中，从而增加氧含量。PFC 颗粒可能不仅运输氧气，还可以提供许多粒子组成的铺路石或动力链以传递氧气从而利于从 RBC 释放到组织中^[36,43]。当 RBC 浓度较低，FiO₂ 较高且在毛细血管床中时，PFC 乳剂的功效可达最大。尽管在循环中 PFC 溶氧的数量小于 Hb 溶氧量，但总的来说 PFC 对携氧和组织氧分压的贡献是显著的。

混合静脉血氧分压（PvO₂），即组织吸取其所需氧后剩余的氧压，经常用来描述组织氧化作用的总指标。使用 PFC 乳剂后可以持续观察到 PvO₂ 的升高，并伴随着组织氧分压的升高^[36,39,44,45]。现在研发了一种模型，可以用于计算一定量 PFC 对于特定患者的效果，且仅当使用临床数据时有效^[46]。PFC 对氧耗的贡献与可以用血红蛋白等同值描述^[47]。

表 2 商业开发达到一定程度的全氟碳乳剂

商品名	公 司	全氟碳化合物 ¹⁾	浓度		表面活性剂	备 注	注册状态	
			(v/v) /%	(w/v) /%				
Fluosol®	日本绿十字公司	FDC/FTPA 7 : 3	6/7	11	20	Pluronic F68, 卵磷脂, 油酸钾	冻干乳剂, 用前稀释重建	1989 年 美 国 批 准 PTCA, 后中断开发
Oxypherol® (Fluosol-43)	日本绿十字公司	FTBA	5	11	20	Pluronic F68	器官滞留多	实验用, 中断开发
Perftoran	俄罗斯公司	Perftoran FDC/FMCP 7 : 3	6/8	11	20	泊 洛 沙 姆, 卵磷脂	器官滞留多	1996 年俄罗斯批准
FMIQ 乳剂	日本绿十字公司	FMIQ	10	13	25	卵磷脂, 油酸钾		未开发
Addox®	美国 Adamantech 公司	“FMA” ²⁾ FDN	11	21	40	卵磷脂	低 PFC	放弃
Therox®	美国杜邦公司	F-44E	3	40	78	卵磷脂	研究用	中断开发

续表

商品名	公 司	全氟碳化合物 ¹⁾	浓度		表面活性剂	备 注	注册状态
			(v/v) /%	(w/v) /%			
Oxyfluor®	美国 HemaGen-PFC 公司	PFDCO 9	40	78	卵磷脂	加 saffoil 油稳定	CPB 二期临床, 放弃
Oxygent® (AF0144)	美国 Alliance 公司和 Baxter 公司	PFOB/PFDB 1/2	32	60	卵磷脂	加 PFDB 稳定	普外科完成三期临床

1) 缩写见表 1。

2) “FMA” 全氟甲基金刚烷。

5. 早期乳剂——全氟化学血液代用品 Fluosol

第一种生理调节的 PFC 乳剂 (氟代丁基四氢呋喃, FX-80, 4) 于 1967 年首次用于离体大鼠大脑的氧合^[48]。不久几乎所有吸氧大鼠的 RBC 都被以泊洛沙姆为稳定剂的氟代三丁胺 (FTBA) 乳剂所替代^[49]。但 FTBA 在动物器官停留时间过长, 幸运的是, 人们发现了氟代蔡烷 (FDC, 6), 它可以在服用后数周内排泄出来 (器官半衰期约为 7d)^[50,51]。但是人们认识到稳定的 PFC 乳剂在机体停留时间过长, 而能够很快排泄的 PFC 乳剂的稳定性没有实用性^[29]。

首个商业开发的乳剂——Fluosol DA (由日本大阪的绿十字公司研制) 使用 6 和氟代三丙胺 (FTPA, 7, PFC 总量的 30%) 的混合物作为稳定剂 (表 2)^[52,53]。但产品的稳定性仍然很差: Fluosol 在储存和运输期间必须冷冻, 且在使用前重建。它采用包括泊洛沙姆-188 (Pluronic® F-68) 和少量卵磷脂及油酸钾在内的表面活性剂体系。泊洛沙姆使其具有空间稳定性, 而油酸钾使液滴带上负电荷, 以对抗絮凝作用。

俄罗斯科学院/Perftoran 公司^[43,54] 研究了一种用泊洛沙姆做乳化剂商品名为 Perftoran 的 20% (质量浓度) 的乳化剂, 它基于 FDC 和 F- [1-(4-甲基环己基) 哌啶] (FM-CP, 8) 的混合物。Perftoran 经过了过滤除菌, 在 4~8℃ 可以稳定储存 1 个月, 但是长期保存需要冷冻。1997 年俄罗斯卫生当局批准其可以应用于一系列的适应证。供实验使用的一种高度稳定的 20% (m/v) 的氟代四丁基野芝麻碱/Pluronic F-68 乳剂, Fluosol-43 (后命名为 Oxypherol)^[52], 已上市多年, 供试验用。

第二代乳剂^[26]

Fluosol 的缺点包括: 氟代三丙胺在器官停留时间过长 (在网状内皮系统的半衰期为 65d)、激活补体反应、由 Pluronic 引发的血液动力学效应、过度稀释和缺少用户友善性。产品主要有三种独立的制剂组成: 主成分乳剂和两种附加的盐溶液。必须把主成分乳剂小心解冻, 依次和附加的盐溶液混合, 重建的产品必须在 8h 内使用。步骤麻烦、使用窗短、注射前需要给患者小剂量试验, 以确认患者是否对普朗尼克过敏, 这些都是该产品难以在商业上获得成

功的原因。

对 Fluosol 进行评估发现, 该乳剂确实能够携带并输送预期量的氧气到组织。同时还证实大剂量使用 PFC 不会有明显的副作用, 并得到了 PFC 药理学方面的有用信息。从开发 Fluosol 的过程中得出的重要结论是: 如果应用 PFC, 必须增强它的稳定性; 标准冷冻条件下, 至少保存 1a 是必不可少的; 粒径要小 (0.1~0.2μm), 且在加热灭菌和储存期都应该保持同样的粒径, 因为小粒径可以使在血管内停留时间较长且减少副反应^[55~57]; 还有一点也是必需的, 即乳剂在保持液态的条件下达到一定的浓度。综合手术应用方便、销售和生等因素, 选择 PFC 的浓度为 60% (质量浓度)。

选择氟碳化合物——全氟代溴辛烷

选择合适的 PFC 和生产稳定的乳剂对于开发安全有效的、基于 PFC 的氧载体非常重要。主要的选择标准是 PFC 能快速排泄稳定乳剂能力强、有较好的溶氧能力和耐受性。另外, 在选择时还要考虑到其可生产性和生产成本的高低。

PFC 的排泄性基本上来说是其相对分子质量 (M_w) 的指数函数 (图 2)。除相对分子质量外, 成环、分支或杂原子的出现等结构特征均对其影响不大。PFC 排泄要求其在脂质中有一定的挥发性和溶解度, 这和排泄速率对 M_w 的依赖是一致的。但 M_w 减小时, 蒸气压有升高的趋势, 这往往会导致肺部并发症^[52,58], 因此 PFC 蒸气压有一个适当的上限 (20Torr 左右)。适合静脉内使用 PFC 的相对分子质量的范围较窄 (为 460~520)^[29]。

这样最后确定了一种候选 PFC, 它的停留时间要短于单纯从 M_w 出发预测的停留时间, 能够产生稳定乳剂。该 PFC 是 1-*n*-氟代溴辛烷 (PFOB, 1)。最初研究它是因为溴原子提供的射线不透性可以用作造影剂^[59]。

由于末端溴原子暴露在外, 使 PFOB 的亲脂性较低, 从而引起 PFOB 有较快的排泄速度 (剂量为 2.7g/kg 时, 人体内停留时间约为 3d)。这种亲脂性便于循环中的脂质摄取 PFC 并利于其在体内转运^[60,62]。另外, 生产的 PFC 的纯度可以高于 99.9%。生产能力已达 100t/a, 并且生产规模还能扩大。在 PFC 中 PFOB 对 O₂ 和 CO₂ 的溶解能力是最高的 (表 1)。当使用磷脂作为乳化剂时, 其乳剂的稳定性得到改善。对 PFOB 进行临床评估, 在液体通气方面, 因

式中: $C(\infty)$ 是 PFC 在水相中的溶解度, $C(\infty)$ 在 PFC 之间差异显著, 对微粒半径随时间的增长有显著影响 (图 3)。

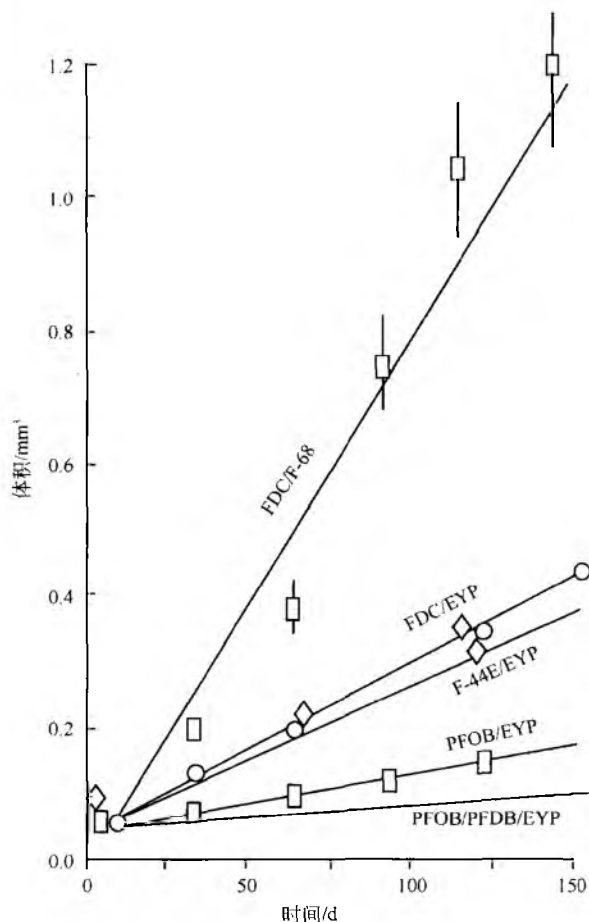
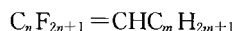


图3 多种 PFC 和表面活性剂 (F-68 指 Pluronic F-68, 其他缩写见表 1) 制成的乳剂体积随时间的增大而增大^[32]

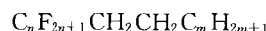
只要分散相中加入少量的水溶性稍低的组分, 乳剂中的分子扩散就可以有效降低^[71], 若为 PFC 乳剂, 可以用另一种 M_w 更大的 PFC^[31,69,70]。Fluosol 中的 7 和 Perftoran 中的 8 也起到了类似的作用, 但均以器官半衰期延长为代价, 分别约为 65d 和 90d。

在 Oxygent AF0144 中, 使用了一种亲脂性的 PFOB (其网状内皮系统半衰期为 25d) 类似物, 作为相对分子质量较大的稳定添加剂, 可以减轻随 M_w 的增加而引起的器官半衰期的不可避免延长^[31,62]。

用氟处理过的表面活性剂 (或氟代表表面活性剂, 即氟碳基团作为疏水末端的表面活性剂) 可以降低 PFC/水界面张力 (σ)^[72], 所以是制备特别稳定的 PFC 乳剂的另一种途径。但是迄今为止, 还没有就这种方案进行研究, 部分原因是这样做会增加对新的活性辅料的评估批准, 从而增加成本。另一种途径是普通磷脂与氟碳-氢碳双嵌段化合物混合用, 如 14 和 15, 可以有效增加基于卵磷脂的 PFC 乳剂的稳定性。这种双嵌段化合物具有亲氟-亲脂的两重性质, 可以改善磷脂膜在 PFC 液滴表面的吸附情况。



14



15

3. 原材料的获取和乳剂的制备

原材料的来源可靠、易于制备、成本-功效性对于一种氧载体的接受程度、应用范围和市场成功是至关重要的。氧载体必须取代相当比例的、现今使用的血液和袋装 RBC 才能对现在的医疗有明显影响。该数字的 10% 就代表美国使用的 RBC 超过 100 万单位, 全球使用的 RBC 为几百万单位。只有以这种数量级生产的成本和血液相仿的氧载体才可能缓解当前和计划中的血液短缺问题。

从原材料的获取、纯度、安全性和成本-功效性方面考虑, 合成 PFC 有明显的优势。在严格的质量标准下, 使用成熟的工艺可以生产出任意量的高纯度的 PFC。例如, PFOB 可以直接从生产线上生产, 而该生产线也可以生产聚四氟乙烯 (如 Teflon®) 多种大量的工业表面活性剂。

制药工业已经掌握了按 GMP 大量生产注射用乳剂的技术。生产注射用的无菌 PFC 乳剂不仅依赖于现有的技术, 还需要一定的窍门。药剂领域长期使用卵磷脂, 包括生产注射用脂肪乳剂, 近来应用于脂质体。PFC 乳剂的处方工艺是加成的, 按使用的原材料, 产率是定量的。在标准条件下, 现在产品使用加热灭菌。对一定规模的生产 PFC 乳剂的设备的投资几乎比生产同等规模血红蛋白制品的小一个数量级, 可以重现地得到粒径较小的 PFC 颗粒和较窄的分布。

对于基于卵磷脂的 PFC 乳剂, 第一步要将水不溶性的磷脂分散于生理盐水中, 然后将 PFC 加入这种水相中, 使用高速转子-定子剪切匀浆器将其打碎为较大的液滴 (平均粒径约为 $5\mu\text{m}$)。预混液使用高压匀浆器提供的高能密度^[31], 最终完成乳化。整个生产过程中都要求尽量不与氧接触 (通过氮气喷射和覆盖), 使用不含热原的注射用水和环境中没有颗粒。Gaulin 型高速匀浆器易于操控, 乳粒分布狭窄一致, 并且可以大规模生产, 所以工业生产药用乳剂优选该设备。

4. 目前的 Oxygent AF0144 乳剂

一种浓缩的 (60%, w/v) PFOB/PFDB 乳剂 (Oxygent AF0144 乳剂) 目前在商品化规模的工厂生产^[31]。这种乳剂使用旋转高压灭菌锅在 121°C 左右进行蒸汽灭菌, 该工艺能达到均匀的热渗透, 保持乳剂的完整性, 并达到预期的目的, 使细菌残留低于百万分之一。同 Fluosol 相比, Oxygent 的特点如下: 因为使用了 PFC 而具有亲脂性、使用磷脂为乳化剂而不是泊洛沙姆、PFC 的浓度成倍增长、处方的简化、稳定性的增加以及使用非常方便。

Oxygent AF0144 是一种氟代溴烷的乳剂, 它易于使用, pH 平衡且等渗, 包含质量分数为 60% 的 PFC (约为 32vol%), PFC 主要为 PFOB (法国 Pierre Benite 的 AtoFina), 使用少量的 PFOB 作为稳定添加剂, 且以卵磷脂为乳化剂。使用 NaCl 调整摩尔渗透压浓度, 磷酸盐缓冲液调整



pH。少量的维生素 E 和 EDTA 用以保护磷脂防氧化。加热灭菌后平均粒径约为 $0.16\mu\text{m}$ ，黏度约为 5cP （从 0 剪切速率外推而得）。在 $5\sim 10^\circ\text{C}$ 下产品可储存至少 18 个月^[31]。表 2 列出了其他一些使用卵磷脂为乳化剂的后 Fluosol 处方。

药代动力学

循环中的 PFC 液滴受调理素作用，并逐步被循环单核细胞和网状内皮系统的固定巨噬细胞清除出血流，较大的液滴先被清除。该机制是乳剂在血管内保留时间有限的主要原因。PFC 暂时储存在网状内皮系统的主要器官——肝脏、脾脏和骨髓中，随后 PFC 分子缓慢地通过细胞膜进行扩散（限速步骤），从网状内皮系统的器官回到血流，在血流中被循环的脂质载体（脂蛋白和乳糜微粒）摄取^[31,56,60,74]。这些步骤的速率主要取决于 PFC 的相对分子质量和亲脂性。PFC 最终以原型通过呼气中的气泡从血中释放出来。也有一些 PFC 没有通过上述途径释放，分布于脂肪组织和其他一些富含脂肪的组织。目前尚无 PFC 代谢和酶解的报道。

$t_{1/2}$ ，即乳剂的循环半衰期，取决于乳粒的粒径、种类和剂量。它随粒径的减小明显增大^[52,57]。对于 Fluosol^[52]，当给药剂量为 4gPFC/kg 和 6gPFC/kg 时，半衰期分别为 7.5h 和 22h；而给药剂量为 1.2g/kg 和 1.8g/kg 时，Oxygent 的半衰期分别为 6.1h 和 9.4h。这说明了人体内乳剂的循环半衰期有剂量依赖性。推荐粒径一般小于 $0.2\mu\text{m}$ ，因为这样的乳粒利于氧气扩散，并且与大粒径微粒相比不易被吞噬，所以在血管内停留时间较长且副作用较少。PFC 对网状内皮系统器官的形态和功能的影响已经研究的比较透彻，结论认为造成的影响是可逆且无害的^[56,76,77]。

四室药代动力学模型（PFC 乳剂在血液中、在网状内皮组织中、在非网状内皮组织中、溶解在血液脂蛋白中）表明，PFC 排泄的限速步骤是在脂质载体中的溶解性，这证实了脂溶性在 PFC 排泄过程中的重要作用^[31]。

功效

用第一代和第二代 PFC 产品进行的为数众多的实验动物模型试验和临床试验已经证实了 PFC 乳剂体内携氧的功效。用 PFC 乳剂灌注耗氧动物使其血细胞比容达到 1%，动物在灌注中存活下来^[49,67]。尽管动脉总氧含量降低了，但混合静脉氧分压（ $P\bar{v}O_2$ ）却显著增加。当红细胞出现时，血红蛋白几乎全部被氧饱和。

用 Fluosol 进行临床试验，证实该产品可以有效改善贫血患者的氧耗，并能立刻缓解这些患者的情况^[78~81]。例如，对严重贫血的、需氧的外科手术患者，给予 4g/kg 的 PFC，可以使携氧量增加 7%，患者耗氧量增加 24%，而动脉氧含量只增加了 0.8%（ v/v ）^[78]。并且 $P\bar{v}O_2$ 约增加了 60%，混合静脉血 Hb 饱和度（ $S\bar{v}O_2$ ）可达 90%。Fluo-

sol 的释氧作用具有非常重要的临床意义。另一项针对外伤严重失血患者的研究证实 Fluosol 能有效释氧，并且可以提供不少于患者自体 RBC 产生氧耗的 $(28\pm 7)\%$ ^[79]。但是好处只是暂时的，不能改善出于宗教原因而拒绝输血的患者状况，这说明这类产品不适合用于持续性贫血的治疗。因此 20 世纪 80 年代早期 FDA 并未批准将 Fluosol 用于这种病症的治疗。1989 年 Fluosol 被批准用于高危患者的血管造影中，这说明该用途中 Fluosol 的功效（缓解心肌缺血^[82,83]）和安全性已经得到证实。Fluosol 未能被接受，不是因为携氧能力差或者有副作用，而是因为稳定性差，适应证和使用策略不适当，还因为经皮透腔冠状血管成形术的自体灌注导管已经有所发展。

在多种动物模型^[39,84]和外科手术患者^[85]身上，已经证实 Oxygent AF0144 具有可以改善系统氧合情况的功效。PFCs 能够明显增加携氧，这同计算机模拟得出的结论是吻合的。例如，给予吸氧狗 2.7g/kg 的 PFC，虽然只提供了总血氧含量的 8%~10%，但占总耗氧量的 25%~30%，这就允许在机体 Hb 水平低至 2.0g/dL 时仍能保持耗氧水平 V_{O_2} ^[84]（图 4）。在 $P\bar{v}O_2$ 不低于起始的 100% 氧呼吸基线的前提下，使用 PFC 的狗失血量可以达到 70mL/kg （大约是总血量的 $2/3$ ），而对照组只有 10mL/kg 。可以观察到骨骼肌、肠道和脑部的组织氧压明显升高。另一项同类型的研究得出的结论认为，在用容量代偿失血模型模拟手术失血的实验中^[39]，通过对间接的通用指标（ $P\bar{v}O_2$ 和 V_{O_2} ）以及肝脏和骨骼肌表面的组织氧分压直接测量，证明该乳剂在维持组织氧合情况方面和灌注新鲜的自体 RBC 一样有效。对狗进行血液稀释至 Hb 为 3g/dL ，而不会对组织的氧合情况有不利影响。同样当狗失血至 $P\bar{v}O_2$ 为 25Torr 或更低时，用氟化氧进行复苏可以恢复 $P\bar{v}O_2$ 并且使狗复活，对照组使用 Ringer's 溶液复活率仅为 62%，且对照组的 $P\bar{v}O_2$ 明显

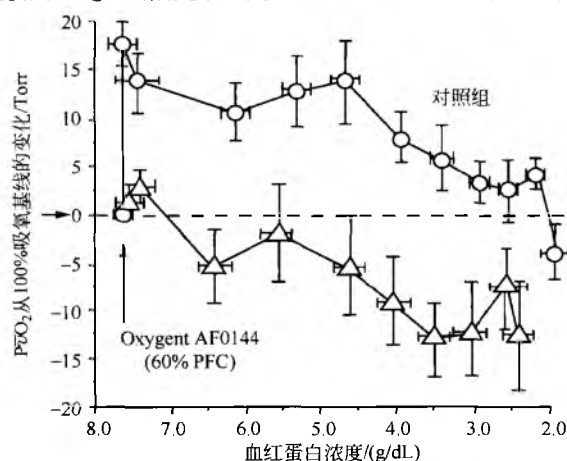


图 4 Oxygent 对模拟外科失血的犬模型在急性等容血液稀释后的作用。治疗组 and 对照组血液均稀释至血红蛋白水平 8g/dL ，x 轴为吸氧和失血后的血红蛋白浓度。在容量代偿性失血过程中，相对于吸氧基线值 $P\bar{v}O_2$ 的改变（y 轴）在两组间有明显差别^[45]



降低,即组织的氧化情况明显不足^[86]。在外科失血至红细胞比率为20%时,PFC提供40%的氧消耗^[63]。在外科手术患者的Ⅲ期临床研究中Oxygent的临床功效得到了证实。参见增强的自体血液回输技术的有关部分(A-ANHSM)。

使用Oxygent能够从以下一些方面证实小剂量的PFC可以明显改善组织的氧合^[26,32,33,45],包括:有PFC存在的情况下,离体骨骼肌工作所需的最大耗氧量增加;可以有效防止犬模型心脏功能的低流量冠状缺血;离体大鼠心脏冠脉灌注停止后一段时期内,心脏组织的氧合情况得以维持;离体家兔心脏的冷心脏停搏后,心肌的氧供及有氧代谢得以改善;随PFC给药剂量的依次递增,狗心肺分流中的 $P\bar{v}O_2$ 也有了相应增加;对狗进行脑干局部缺血试验后,其脑部功能得以保存;猫的视网膜氧分压和脑部氧合情况有了显著增加;静脉输注乳剂后猫的主视皮质组织的氧分压有所改善;严重失血后大鼠的脑部氧供得以恢复;经历过由冷心脏停搏和最终的体温正常的再灌注引起的CPB、整心肌缺血的狗,其收缩功能、心肌水肿的复原情况以及由PFC引起的心麻痹酸中毒得以改善;心肌、肠黏膜、肝脏、肺、肾和骨骼肌的局部器官灌注得以保持;离体家兔心脏心肌氧供及对低流量缺血(于一些外科手术中发现)的耐受性有了改善;肿瘤的氧供得到改善且肿瘤对放射和化疗的敏感性增强。

安全性

用适当的方法制备的PFC的急性毒性比较低。浓度为20%和35%(w/v)的Fluosol在大鼠体内静脉注射的LD₅₀分别为26~29gPFC/kg体重和35gPFC/kg体重,这说明注入的体积(130~145mL/kg和101mL/kg)对LD₅₀值有一定的影响^[52]。据报道,Perftoran也存在类似的情况^[43]。给大鼠服用100%(质量浓度)的PFOB乳剂(52vol%),LD₅₀值达到41g/kg体重^[87]。适当纯化和配方的PFC乳剂无致癌性、诱变性、致畸性和免疫原性。一些患者服用Fluosol^[64]后出现的过敏反应与处方中使用泊洛沙姆作为表面活性剂有关,它能激活补体。使用卵磷脂的乳剂不会观察到上述现象^[56,65,88]。

用早期100%和90%(质量浓度)的PFOB制剂^[56]和Oxyfluor^[63]进行临床试验,在灌注过程中和灌注后不久观察到的早期副作用包括头疼和间歇性后背疼痛,后期(2~12h)副作用类似流感症状,即发烧、间歇性寒战、恶寒^[56,75]。这些反应是轻微短暂的,且在4~12h内是可逆的。给药后3d可以观察到血小板计数有一个短暂的轻微的下降(约15%)。据记载注入脂肪乳剂和脂质体后也可以观察到类似的现象,说明这些效应可能与乳剂的微粒性质有关。

流感样副作用大部分与液滴从血液中渐进式清除有关。这些作用是巨噬细胞吞噬作用的自然结果,吞噬作用同时有由花生四烯酸级联反应产物包括前列腺素和致热细胞活素等的释放^[56,63]。

与微粒有关的副作用的强度和频率主要取决于微粒的粒径^[52,57]。对Oxygent乳剂处方和工艺参数的调整(尤其是加入PFDB,有助于减小微粒粒径和缩小微粒粒径分布范围),可以明显降低副作用^[57]。在清醒的志愿者身上进行60%(w/w)Oxygent的AF0144最优处方临床安全性研究中,可以观察到发热现象出现的频率明显低于前一个处方,并且几乎不超过1℃;血小板计数在正常范围内出现暂时性的降低^[75,89]。对健康志愿者的血小板功能、凝血参数、补体激活反应、免疫反应、变态反应、血管收缩和微循环紊乱没有影响,且正常剂量范围内,肝脏、肺和肾脏功能没有出现异常,血液化学方面也没有出现有临床意义的变化^[90]。服用氧化氟也没有出现补体激活反应^[88]。对矫形外科患者进行了一系列的Ⅱ期研究,没有发现与乳剂有关的严重的副反应^[91]。

PFC不能与一氧化氮反应从而将其清除,并且用使用卵磷脂的PFC进行的临床研究表明,PFC不会影响血流动力学,不能增加血管阻力和动脉压,也不会降低心输出量和心率。心输出量随血液稀释而增加。包括出血时间在内的凝血功能不受Oxygent影响^[89]。

FX-80和FDC是一类易挥发的PFC,对服用含该类PFC的Fluosol和乳剂的家兔进行尸检时发现其肺部不能收缩,这说明这类PFC对肺部可能有害^[58]。这种现象与肺部残气量(IPRV)增加有关,是由气泡内空气滞留引起的^[92],该现象具有种属特异性,且取决于PFC的蒸气压,而服用过含FDC的Fluosol的患者却没有出现这种现象。向Oxygent中的PFOB加入少量的PFDB可以进一步使PFC相的蒸气压降低至小于8Torr,这可以消除大多数敏感动物的IPRV现象^[56]。

主要适应证

1. 手术

在一种最近确定的用于减少手术中输血量 and 增加手术安全性的新方案中,使用氧载体并结合使用急性正常血容稀释术(A-ANH)^[26,91,93]。A-ANH手术程序(图5)包括首先在手术即将开始时采集一些患者血液,通常为2~4单位。这些血液暂时储存在手术室,然后代之以血浆扩张剂用以维持常规循环体积。手术中需要输血时,输入O₂载体代替。这样可以安全维持组织的氧合情况,并且使红细胞比容较低,从而使伴随手术失血丢失的RBC减少。当红细胞太少或手术结束时,再将患者自身的安全、新鲜且功能良好的血液回输至体内。

A-ANH手术期望在不损害组织氧合的情况下进一步地稀释血液,从而减少外援血的输入^[26,40,93,94]。乳剂有助于医生在更安全有效的方式下实施ANH,所以乳剂应该利于ANH在手术患者(美国一年约有600万人)中的推广使用。另外,在这种方法中患者成为自身的血液供体,有助于减轻血库的负担。该策略已成为氧载体的主要适应证。

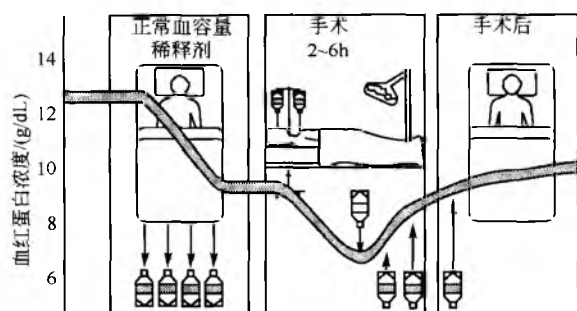


图5 A-ANH的手术过程。在A-ANH过程中，在手术前从病人身上抽取2~4单位的血，用容量血浆扩张剂替代。手术中需要输血时，输入PFC乳剂代替RBC，这样可以防止组织的缺氧。当血红蛋白低至不安全水平时，或在手术后，再将患者自身的安全、新鲜且功能良好的血液回输至体内。A-ANH可望提高安全性，减少接触异源血，还有助于减轻血库的负担（Alliance制药公司提供）

Oxygent的临床试验数据证实了该预期。ANH术后即使用只使用0.9g/kg剂量的PFC也能使 $P\bar{v}O_2$ 维持在给药前水平甚至更高^[85]，而Hb水平却随手术过程中的失血而降低。多中心随机Ⅱ期临床试验涉及进行了选择性ANH外科手术的患者，该试验证实1.8g/kg剂量的PFC比在可逆的生理输血指征条件下新鲜的自体血有效得多^[40,75,91]（比去除2,3-DPG的库存RBC更有效）。使用PFC乳剂有效延缓了输入自体血的需求。同时，黏性降低对心输出量的好处也得以保留。对临床数据进行评估发现在上述条件下1.5g血红蛋白等价于1g的PFOB^[47]。近日Alliance制药公司宣布，该公司于欧洲（8个国家的33个中心）进行的Oxygent在外科手术患者的Ⅲ期临床试验成功地减少了对输血的需求。该项研究的目的是证实根据A-ANH程序使用的Oxygent同标准的输血治疗法相比，能否降低对输血的需求。对研究人群进行统计学处理，发现能有效降低对供体血的需求。需要输血（即轻度到高度失血）的患者（登记患者的86%）是目标人群。同接受常规输血的对照组患者相比，Oxygent明显的避免（ $P=0.002$ ）和降低（ $P<0.001$ ）了对输血的需求。目前尚无安全性方面的报道。

2. 心肺旁路手术和神经元保护剂

用PFC乳剂进行的A-ANH有望能在心肺旁路手术（CPB）中发挥重要作用^[95,96]。之前向冠外循环的溶液中加入氧载体可以减少异源RBC的输入，同时还能增加机体氧供。此项临床Ⅲ期试验已在欧洲和美国的手术患者中在CPB支持下进行。另外，由于PFC既能溶解氧气又能溶解氮气，因此可能溶解小气泡，进入CPB回路中引起微栓塞。因此可以用于减少心血管CPB术后患者脑血管损伤的发生或者降低其严重性。

3. 灌注的桥梁

在急需提高组织氧合和输入相容性外源血间、灌注和

灌注生效之间存在空白时间段，在多种情况下需要使用PFC乳剂进行填补。外伤就是这样一种情况，尤其是在到达医院前决定患者结局的“黄金时段”。在这期间难以获得血液，而储备血又不能立即发挥作用。氟碳化合物乳剂可以稳定等待治疗的患者的情况，因此救护车和其他急救交通工具常备有氟碳化合物乳剂。

4. PFC乳剂的其他适应证^[26,32~34,40,97~99]

除CPB外，PFC乳剂在心血管疾病领域还有许多的治疗作用，包括用于治疗急性动脉硬化症、心麻痹、再灌注、冠状动脉造影和维持用于移植的供体心脏。PFC乳剂携氧能力强，粒径小，黏度低，这些性质有助于改善灌注和组织氧合情况。目前正在研发可以治疗心搏骤停的PFC。

在工业化国家，脑卒中是主要的死亡原因之一。大脑对缺氧非常敏感。在血管阻塞的情况下，粒径较小的PFC微粒可以通过更小的侧血管，以改善灌注情况并向缺血组织供氧。和输血不同，输入PFC不会增加血液黏度。目前正在研究如何通脑室-池路线用PFC对大脑实施灌注。

实体瘤血管系统化较差，通常包含一些对治疗耐受的缺氧细胞。PFC乳剂可以对肿瘤组织供氧，从而可以在不影响正常细胞耐受性的情况下，提高肿瘤细胞对放射和化疗的敏感性。

使用富含PFC的灌注液可以提高适于移植的器官的可获得性和质量。已知这类制剂经常用于保存肝脏、肾脏、肺、心脏和胰腺等器官。

已经研发出了多种基于PFC的造影剂，用于计算机X射线断层造影（CT）、磁共振（MR）和超声（US）成像等诊断技术。PFC乳剂也用于组织 O_2 作图，因为顺磁性 O_2 分子可以干扰 ^{19}F 的核磁共振信号。

PFC乳剂作为氧载体还可以用于治疗镰刀性细胞贫血；在某些呼吸衰竭的情况下，可以替代肺部供氧进行腹膜内灌注；救治CO中毒患者；治疗减压病；进行“全身清洗”，以去除毒素、病毒、过高剂量的药物等；治疗急性胰腺炎；出血休克时保护胃黏膜不受损伤；稳定和动物模型、器官和组织；还可以作为药物转运系统。

5. 乳剂外其他形式的全氟化合物在医学上的应用^[72,98~100]

目前正在研发可用于超声成像的PFC稳定的微泡造影剂。Alliance制药公司研发的Satpad[®]是一种外用的填充了PFC的垫子，当MR成像中采用了脂肪饱和技术（fat saturation technique）时，可以用于改善磁均匀性，进而改善成像质量；向眼部填充纯的PFC，可用于治疗复杂的视网膜剥离和矫正晶状体错位。其他潜在的临床用途包括：作为血液供氧剂应用于临床；通过液体呼吸预防屈肢痛；治疗缺血性溃疡；保存动物和植物的种子和精液、组织和移植体；促进动植物细胞培养的生长速度；对肺部给药。氟化的油水两亲分子是多种胶质和超分子药物转运系统的重要成分。

X

展望

在血液替代品的开发过程中, 血红蛋白作为氧载体看似天然的途径, 并因此吸引了许多人的兴趣并付出努力, 同时越来越多的试验和临床数据表明 PFC 途径同样也有它的优点, 包括: 成分单一; 有化学和生物惰性; 由于 O_2 的溶解与 FiO_2 相关, PFC 能提供更大的氧耗; 正常血容量稀释后, 心输出量增加能够维持且能够有效排泄。另一个优点是基于 PFC 的氧载体不需采集人体或动物血, 也不依赖于基因工程改造的血红蛋白。PFC 的生产规模可以适应任何量的需求。乳剂生产过程产量高, 成本低。PFC 乳剂对热稳定, 使用方便且储存时间长。它们不会引起血管收缩, 也不会影响向组织供氧的药理学反应。

PFC 乳剂和正常血液稀释术一起有潜力直接改善手术中自体新鲜血的调度, 从而提高安全性, 缓解血液短缺。因此血液替代有望为灌注医学带来根本性的变革。

将来的研究目标是进一步提高乳剂的稳定性, 减少副作用, 延长循环时间并发掘新的治疗用途。

参考文献

- Schreiber, G. B.; Murphy, E. L.; Horton, J. A.; Wright, D. J.; Garfein, R.; Chien, H. C.; Nass, C. C. Risk Factors for Human T-cell Lymphotropic Virus Types I and II (HTLVI and-II) in Blood Donors: The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *J. Acquir. Defic. Syndr. Hum. Retrovirus* 1997, 14, 263—271.
- Fiebig, E. Safety of the Blood Supply. *Clin. Orthopaed. Rel. Res.* 1998, 357, 6—18.
- Goodnough, L. T.; Brecher, M. E.; Kanter, M. H.; Aubuchon, J. P. Transfusion Medicine: Blood Transfusion. *New Engl. J. Med.* 1999, 340, 438—447.
- Zuck, T. F. Legal Liability for Transfusion Injury in the Acquired Immune Deficiency Syndrome Era. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1990, 114, 309—315.
- Dodd, R. Y. Transmission of Parasites by Blood Transfusion. *Vox Sang.* 1998, 74, 161—163.
- Scott, M. R.; Will, R.; Ironside, J.; Nguyen, H. -O. B.; Tremblay, P.; DeArmond, S. J.; Prusiner, S. B. Compelling Transgenic Evidence for Transmission of Bovine Spongiform Encephalopathy Prions to Humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, 96, 15137—15142.
- Andrews, N. J.; Farrington, C. P.; Cousens, S. N.; Smith, P. G.; Ward, H.; Knight, R. S. G.; Ironside, J. W.; Will, R. G. Incidence of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in the UK. *Lancet* 2000, 356, 481—482.
- Ricketts, M. N.; Cashman, N. R.; Stratton, E. E.; El-Saadany, S. Is Creutzfeldt-Jakob Disease Transmitted in Blood. *Emerg. Infect. Dis.* 1997, 3, 155—163.
- Mitka, M. Will TSEs Taint the U. S. Blood Supply. *J. Am. Med. Assoc.* 1999, 281, 1157—1158.
- Landers, D. F.; Hill, G. E.; Wong, K. C.; Fox, I. J. Blood Transfusion-Induced Immunomodulation. *Anesth. Analg.* 1996, 187—204.
- Wheatley, T.; Veitch, P. S. Effect of Blood Transfusion on Postoperative Immunocompetence. *Brit. J. Anaesth.* 1997, 78, 489—492.
- Houbiers, J. G.; van de Velde, C. J.; van de Watering, L. M.; Hermans, J.; Schreuder, S.; Bijnen, A. B.; Pahlplatz, P.; Schattenkerk, M. E.; Wobbles, T.; de Vries, J. E.; Klementsich, P.; van de Maas, A. H.; Brand, A. Transfusion of Red Blood Cells is Associated With Increased Incidence of Bacterial Infection After Colorectal Surgery: A Prospective Study. *Transfusion* 1997, 37, 126—134.
- Murphy, P.; Heal, J. M.; Blumberg, N. Infection or Suspected Infection After Hip Replacement Surgery With Autologous or Homologous Blood Transfusions. *Transfusion* 1991, 31, 312—317.
- Heiss, M. M.; Mempel, W.; Jauch, K. -W.; Delanoff, C.; Mayer, G.; Mempel, M.; Eissner, H. -J.; Schildberg, F. -W. Beneficial Effect of Autologous Blood Transfusion on Infectious Complications After Colorectal Cancer Surgery. *Lancet* 1993, 342, 1328—1333.
- Purdy, F. R.; Tweeddale, M. G.; Merrick, P. M. Association of Mortality With Age of Blood Transfused in Septic ICU Patients. *Can. J. Anaesth.* 1997, 44, 1256—1261.
- Fransen, E.; Maessen, J.; Dentener, M.; Senden, N.; Buurman, W. Impact of Blood Transfusions on Inflammatory Mediator Release in Patients Undergoing Cardiac Surgery. *Chest* 1999, 1233—1239.
- Moore, F. A.; Moore, E.; Sauaia, A. Blood Transfusion. An Independent Risk Factor for Post-injury Multiple Organ Failure. *Arch. Surg.* 1997, 132, 620—625.
- Blumberg, N.; Heal, J. M. Immunomodulation by Blood Transfusion: An Evolving Scientific and Clinical Challenge. *Am. J. Med.* 1996, 101, 299—308.
- Vamvakas, E. C. Transfusion-Associated Cancer Recurrence and Postoperative Infection: Meta-Analysis of Randomized, Controlled Clinical Trials. *Transfusion.* 1996, 36, 175—186.
- Edna, T.; Bjerkeset, T. Perioperative Blood Transfusions Reduce Long-Term Survival Following Surgery for Colorectal Cancer. *Dis. Colon Rectum* 1998, 41, 451—459.
- Heiss, M. M.; Mempel, W.; Delanoff, C.; Jauch, K. -W.; Gabka, C.; Mempel, M.; Dieterich, H. -J.; Eiss-



- ner, H. -J.; Schildberg, F. -W. Blood Transfusion-Modulated Tumor Recurrence: First Results of a Randomized Study of Autologous Vs Allogeneic Blood Transfusion in Colorectal Cancer Surgery. *J. Clin. Oncol.* 1994, 12, 1859—1867.
22. Fakhry, S. M.; Sheldon, G. F. Blood Administration, Risks, and Substitutes. *Adv. Surg.* 1995, 28, 71—92.
23. Fitzgerald, R. D.; Martin, C. M.; Dietz, G. E.; Doig, G. S.; Potter, R. F.; Sibbald, W. J. Transfusing Red Blood Cells Stored in Citrate Phosphate Dextrose Adenine-1 for 28 Days Fails to Improve Tissue Oxygenation in Rats. *Crit. Care Med.* 1997, 25, 726—732.
24. Vamvakas, E. C. Epidemiology of Red Blood Cell Utilization. *Transf. Med. Rev.* 1996, 10, 44—61.
25. Wilkinson, S. Proceeding of the Advisory Committee on Blood Safety and Availability; US Public Health Service, 1999; 58—64.
26. Riess, J. G. Oxygen Carriers (Blood Substitutes) — Raison d'Etre, Chemistry, and Some Physiology. *Chem. Rev.* 2001, 101, 2797—2919.
27. Fratantoni, J. C. Red Cell Substitutes: Evolution of Approaches for Demonstrating Efficacy. *Blood Substitutes—Present and Future Perspectives*; Tsuchida, E., Ed.; Elsevier: Amsterdam; 1998; 33—39.
28. Riess, J. G.; Le Blanc, M. Solubility and Transport Phenomena in Perfluorochemicals Relevant to Blood Substitution and Other Biomedical Applications. *Pure Appl. Chem.* 1982, 54, 2383—2406.
29. Riess, J. G. Reassessment of Criteria for the Selection of Perfluorochemicals for Second-Generation Blood Substitutes; Analysis of Structure/Property Relationships. *Artif. Organs* 1984, 8, 44—56.
30. Riess, J. G.; Le Blanc, M. Preparation of Perfluorochemical Emulsions for Biomedical Use: Principles, Materials and Methods. *Blood Substitutes: Preparation, Physiology, and Medical Applications*; Lowe, K. C., Ed.; Ellis Horwood Ltd.; Chichester, 1988; 94—129.
31. Krafft, M. P.; Riess, J. G.; Weers, J. G. The Design and Engineering of Oxygen-Delivering Fluorocarbon Emulsions. *Submicronic Emulsions in Drug Targeting and Delivery*; Benita, S., Ed.; Harwood Academic Publ. Amsterdam, 1998; 235—333.
32. Chang, T. M. S.; Riess, J. G.; Winslow, R. M., Eds.; *Blood Substitutes: General. Proc. Vth Int. Symp. On Blood Substitutes, Vol 1. Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotechnol.* 1994; 22, 123—360.
33. Riess, J. G., Ed. *Blood Substitutes, the Fluorocarbon Approach Proc. Vth Intl. Symp. On Blood Substitutes, Vol 3. Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotech.* 1994; 22, 945—1543.
34. Riess, J. G. Fluorocarbon Emulsions—Designing An Efficient Shuttle Service for the Respiratory Gases—The So-Called “Blood Substitutes” . *Fluorine at the Millennium*; Banks, R. E., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2000; 385—431.
35. Lutz, J.; Decke, B.; Bauml, M.; Schultze, H. G. High Oxygen Extraction Combined With Extensive Oxygen Consumption in the Rat Liver Perfused With Fluosol-DA, a New Perfluoro Compound Emulsion. *Pflügers Arch. (Eur. J. Physiol.)* 1978, 376, 1—6.
36. Faithfull, N. S. Mechanisms and Efficacy of Fluorochemical Oxygen Transport and Delivery. *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotech.* 1994, 22, 181—197.
37. Stehling, L.; Zauder, H. L. Acute Normovolemic Hemodilution. *Transfusion* 1991, 31, 857—868.
38. Kreimeier, U.; Messmer, K. Hemodilution in Surgery: State of the Art 1996. *World J. Surg.* 1996, 20, 1208—1217.
39. Habler, O. P.; Kleen, M. S.; Hutter, J. W.; Podtschaske, A. H.; Tiede, M.; Kemming, G. I.; Welte, M. V.; Corso, C. O.; Batra, S.; Keipert, P. E.; Faithfull, N. S.; Messmer, K. F. W. Hemodilution and Intravenous Perflubron Emulsion As An Alternative to Blood Transfusion: Effects on Tissue Oxygenation During Profound Hemodilution in Anesthetized Dogs. *Transfusion* 1998, 38, 145—155.
40. Spahn, D. R. Current Status of Artificial Oxygen Carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000, 40, 143—151.
41. Poli de Figueiredo, L. F.; Mathru, M.; Solanki, D.; W., M. V.; Hess, J.; Kramer, G. C. Pulmonary Hypertension and Systemic Vasoconstriction May Offset the Benefits of Acellular Hemoglobin Blood Substitutes. *J. Trauma, Inj. Infect. Crit. Care.* 1997, 42, 847—856.
42. Kasper, S.; Grune, F.; Walter, M.; Amr, N.; Erasmi, H.; Buzello, W. The Effects of Increased Doses of Bovine Hemoglobin on Hemodynamics and Oxygen Transport in Patients Undergoing Preoperative Hemodilution for Elective Abdominal Aortic Surgery. *Anesth. Analg.* 1998, 87, 284—291.
43. Ivanitskii, G. R.; Vorob'yev, S. I. Organization of Motile Structures in Blood Flow—The Basis of the Functioning of Perfluorocarbon “Artificial Blood” . *Biophysics* 1996, 41, 189—201.
44. Padnick, L.; Linsenmeier, R.; Goldstick, T.; McRipley, M.; Ahmed, J. Perflubron Emulsion Infusion Improves Tissue Oxygenation in the Cat Brain Under Hyperoxic Conditions. *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotech.* 1996, 24, 398.

45. Flaim, S. F. Efficacy of Perflubron-Based Emulsion As a Temporary Oxygen Carrier. *Red Blood Cell Substitutes*; Rudolph, A. S., Rabinovici, R., Feuerstein, G. Z., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1998; 79—117.
46. Faithfull, N. S.; Rhoades, G. E.; Keipert, P. E.; Ringle, A. S.; Trouwborst, A. A Program to Calculate Mixed Venous Oxygen Tension—A Guide to Transfusion. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994, 361, 41—48.
47. Faithfull, N. S. The Concept of Hemoglobin Equivalency of Perfluorochemical Emulsions. *Adv. Exp. Med. Biol.*, in press (2001).
48. Sloviter, H. A.; Kamimoto, T. Erythrocyte Substitute for Perfusion of Brain. *Nature* 1967, 216, 458—460.
49. Geyer, R. P.; Taylor, K.; Duffett, E. B.; Eccles, R. Successful Complete Replacement of the Blood of Living Rats With Artificial Substitutes. *Fed. Proc.* 1973, 32, 927.
50. Clark, L. C.; Becattini, F.; Kaplan, S.; Obrock, V.; Cohen, D.; Becker, C. Perfluorocarbons Having a Short Dwell Time in the Liver. *Science* 1973, 181, 680—682.
51. Okamoto, H.; Yamanouchi, K.; Imagawa, T.; Murashima, R.; Yokoyama, K.; Watanabe, R.; Naito, R. Persistence of Fluorocarbons in Circulating Blood and Organs. *Proc. IInd Intercompany Conf*; Osaka, 1973.
52. Naito, R.; Yokoyama, K. Perfluorochemical Blood Substitutes. FC-43 Emulsion, Fluosol-DA, 20% and 35%; Green Cross Corp. Osaka, Japan, 1978, 1981.
53. Alpha Therapeutic Corporation. FLUOSOL 20%; Product Monograph Alpha Therapeutic Corp.: Los Angeles, 1990.
54. Ivanitsky, G. R.; Vorobyev, S. I. Perftoran Blood Substitute with Gas-Transporting Function; Product Monograph Perftoran Co.: Pushchino, Russia, 1997.
55. Tsuda, Y.; Yamanouchi, K.; Okamoto, H.; Yokoyama, K.; Heldebrant, C. Intravascular Behavior of a Perfluorochemical Emulsion. *J. Pharmacobio-Dyn.* 1990, 13, 165—171.
56. Flaim, S. F. Pharmacokinetics and Side Effects of Perfluorocarbon-Based Blood Substitutes. *Artif. Cells, Blood Subst., Immob. Biotech.* 1994, 22, 1043—1054.
57. Keipert, P. E.; Otto, S.; Flaim, S. F.; Weers, J. G.; Schutt, E. A.; Pelura, T. J.; Klein, D. H.; Yaksh, T. L. Influence of Perflubron Emulsion Particle Size on Blood Half-Life and Febrile Response in Rats. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.* 1994, 22, 1169—1174.
58. Clark, L. C.; Hoffmann, R. E.; Davis, S. L. Response of the Rabbit Lung As a Criterion of Safety for Fluorocarbon Breathing and Blood Substitutes. *Biomat. Artif. Cells Immob. Biotech.* 1992, 20, 1085—1099.
59. Long, D. M.; Higgins, C. B.; Mattrey, R. F.; Mitten, R. M.; Multer, F. K. Is there a Time and Place for Radiopaque Fluorocarbons. *Preparation, Properties, and Industrial Applications of Organofluorine Compounds*; Banks, R., Ed.; Ellis Horwood: New York, 1982; 139—156.
60. Riess, J. G. Post-Fluosol Progress in Fluorocarbon Emulsions for in Vivo Oxygen Delivery. *La Trasf. Del Sangue* 1987, 32, 316—334.
61. Kabalnov, A. S.; Makarov, K. N.; Shchukin, E. D. Stability of Perfluoroalkyl Halide Emulsions. *Colloids Surf.* 1992, 62, 101—104.
62. Weers, J. G.; Liu, J.; Fields, T.; Resch, P.; Cavin, J.; Arlauskas, R. A. Room Temperature Stable Perfluorocarbon Emulsions With Acceptable Half-Lives in the Reticuloendothelial System. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.* 1994, 22, 1175—1182.
63. Kaufman, R. J. Clinical Development of Perfluorocarbon-Based Emulsions As Red Cell Substitutes. *Blood Substitutes; Physiological Basis of Efficacy*; Winslow, R. M., Vandegriff, K. D., Intaglietta, M., Eds.; Birkhäuser: Boston, 1995; 53—75.
64. Tremper, K. K.; Vercellotti, G. M.; Hammerschmidt, D. E. Hemodynamic Profile of Adverse Clinical Reactions to Fluosol-DA 20%. *Crit. Care Med.* 1984, 12, 428—431.
65. Hammerschmidt, D. E.; Vercellotti, G. M. Limitation of Complement Activation by Perfluorocarbon Emulsions; Superiority of Lecithin-Emulsified Preparations. *Biomat. Artif. Cells Artif. Organs* 1988, 16, 431—438.
66. Ingram, D. A.; Forman, M. B.; Murray, J. J. Activation of Complement by Fluosol Attributable to the Pluronic Detergent Micelle Structure. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1993, 22, 456—461.
67. Long, D. N.; Riess, J. G.; Follana, R.; Burgan, A.; Mattrey, R. F. Preparation and Application of Highly Concentrated Perfluorooctylbromide Fluorocarbon Emulsions. *Biomat. Artif. Cells Artif. Organs* 1988, 16, 441—442.
68. Riess, J. G.; Dalfors, J. L.; Hanna, G. K.; Klein, D. H.; Krafft, M. P.; Pelura, T. J.; Schutt, E. G. Development of Highly Fluid, Concentrated and Stable Fluorocarbon Emulsions for Diagnosis and Therapy. *Biomat. Artif. Cells Artif. Organs* 1992, 20, 839—842.
69. Davis, S. S.; Round, H. P.; Purewal, T. S. Ostwald Ripening and the Stability of Emulsion Systems; An Explanation for the Effect of An Added Third Component.

- J. Colloid Interf. Sci. 1981, 80, 508—511.
70. Kabalnov, A. S.; Shchukin, E. D. Ostwald Ripening Theory: Applications to Fluorocarbon Emulsion Stability. *Adv. Colloid Interf. Sci.* 1992, 38, 69—97.
 71. Higuchi, W. I.; Misra, J. Physical Degradation of Emulsions via the Molecular Diffusion Route and The Possible Prevention Thereof. *J. Pharm. Sci.* 1962, 51, 459—466.
 72. Riess, J. G.; Krafft, M. P. Fluorinated Materials for in Vivo Oxygen Transport (Blood Substitutes), Diagnosis and Drug Delivery. *Biomaterials* 1998, 19, 1529—1539.
 73. Riess, J. G.; Cornélus, C.; Follana, R.; Krafft, M. P.; Mahé, A. M.; Postel, M.; Zarif, L. Novel Fluorocarbon-Based Injectable Oxygen-Carrying Formulations With Long-Term Room-Temperature Storage Stability. *Adv. Exp. Biol. Med.* 1994, 345, 227—234.
 74. Yamanouchi, K.; Tanaka, M.; Tsuda, Y.; Yokoyama, K.; Awazu, S.; Kobayashi, Y. Quantitative Structure—In Vivo Half-Life Relationships of Perfluorochemicals for Use As Oxygen Transporters. *Chem. Pharm. Bull.* 1985, 33, 1221—1231.
 75. Riess, J. G.; Keipert, P. E. Update on Perfluorocarbon-Based Oxygen Delivery Systems. *Blood Substitutes—Present and Future Perspectives*; Tsuchida, E., Ed.; Elsevier, Amsterdam, 1998; 91—101.
 76. Lutz, J. Effect of Perfluorochemicals on Host Defense, Especially on the Reticuloendothelial System. *Int. Anesth. Clin.* 1985, 23, 63—93.
 77. West, L.; McIntosh, N.; Gendler, S.; Seymour, C.; Wisdom, C. Effects of Intravenously Infused Fluosol-DA 20% In Rats. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1986, 12, 1319—1323.
 78. Tremper, K. K.; Friedman, A. E.; Levine, E. M.; Lapin, R.; Camarillo, D. The Preoperative Treatment of Severely Anemic Patients With a Perfluorochemical Oxygen-Transport Fluid, Fluosol-DA. *New Engl. J. Med.* 1982, 307, 277—283.
 79. Gould, S. A.; Rosen, A. L.; Sehgal, L. R.; Sehgal, H. L.; Langdale, L. A.; Krause, L. M.; Rice, C. L.; Chamberlain, W. H.; Moss, G. S. Fluosol-DA As a Red-Cell Substitute in Acute Anemia. *New Engl. J. Med.* 1986, 314, 1653—1656.
 80. Mitsuno, T.; Ohyanagi, H.; Yokoyama, K.; Suyama, T. Recent Studies on Perfluorochemical (PFC) Emulsion As An Oxygen Carrier in Japan. *Biomat. Artif. Cells Artif. Organs* 1988, 16, 365—373.
 81. Spence, R. K.; McCoy, S.; Costabile, J.; Norcross, E. D.; Pello, M. J.; Alexander, J. B.; Wisdom, C.; Camishion, R. C. Fluosol DA-20 in the Treatment of Severe Anemia; Randomized, Controlled Study of 46 Patients. *Crit. Care Med.* 1990, 18, 1127—1230.
 82. Kent, K. M.; Cleman, M. W.; Cowley, M. J.; Forman, M.; Jaffe, C. C.; Kaplan, M.; King, S. B.; Krucoff, M.; Lassar, T.; McAuley, B.; Smith, R.; Wisdom, C.; Wohlgeleit, D. Reduction of Myocardial Ischemia During Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty With Oxygenated Fluosol. *Am. J. Cardiol.* 1990, 66, 279—284.
 83. Forman, M. B.; Perry, J. M.; Wilson, B. H.; Verani, M. S.; Kaplan, P. R.; Shawl, F. A.; Friesinger, G. C. Demonstration of Myocardial Reperfusion Injury in Humans; Results of a Pilot Study Utilizing Acute Coronary Angioplasty With Perfluorochemical in Anterior Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1991, 18, 911—918.
 84. Keipert, P. E.; Conlan, M. G. Advances in Perflubron Emulsion Development: Potential Use During Surgery and Cardiopulmonary Bypass to Avoid Donor Blood Transfusion and Prevent Tissue Hypoxia. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.* 1996, 24, 359.
 85. Wahr, J. A.; Trouwborst, A.; Spence, R. K.; Henny, C. P.; Cernaianu, A. C.; Graziano, G. P.; Tremper, K. K.; Flaim, K. E.; Keipert, P. E.; Faithfull, N. S.; Clymer, J. J. A Pilot Study of the Effects of a Perflubron Emulsion, AF0104, on Mixed Venous Oxygen Tension in Anesthetized Surgical Patients. *Anesth. Analg.* 1996, 82, 103—107.
 86. Goodin, T. H.; Grossbard, E. B.; Kaufman, R. J.; Richard, T. J.; Kolata, R. J.; Allen, J. S.; Layton, T. E. A Perfluorochemical Emulsion for Prehospital Resuscitation of Experimental Hemorrhagic Shock; A Prospective, Randomized, Controlled Study. *Crit. Care Med.* 1994, 22, 680—689.
 87. Burgan, A. R.; Herrick, W. C.; Long, D. M.; Long, D. C. Acute and Subacute Toxicity of 100% PFOB Emulsion. *Biomat. Artif. Cells Artif. Organs* 1988, 16, 681—682.
 88. Rosoff, J. D.; Soltow, L. O.; Vocelka, C. R.; Schmer, G.; Chandler, W. L.; Cochran, R. P.; Kunzelman, K. S.; Spiess, B. D. A Second-Generation Blood Substitute (Perfluorodichlorooctane Emulsion) Does Not Activate Complement During Ex Vivo Circulation Model of Bypass. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 1998, 12, 397—401.
 89. Leese, P. T.; Noveck, R. J.; Shorr, J. S.; Woods, C. M.; Flaim, K. E.; Keipert, P. E. Randomized Safety Studies of Intravenous Perflubron Emulsion I. Effects on Coagulation Function in Healthy Volunteers. *Anesth.*



- Anal. 2000, 91, 804—811.
90. Noveck, R. J.; Shannon, E. J.; Leese, P. T.; Shorr, J. S.; Flaim, K. E.; Keipert, P. E.; Woods, C. M. Randomized Safety Studies of Intravenous Perflubron Emulsion II. Effects on Immune Function in Healthy Volunteers. *Anesth. Analg.* 2000, 91, 812—822.
 91. Spahn, D. R.; van Bremp, R.; Theilmeier, G.; Reibold, J.-P.; Welte, M.; Heinzerling, H.; Birck, K. M.; Keipert, P. E.; Messmer, K. Perflubron Emulsion Delays Blood Transfusions in Orthopedic Surgery. *Anesthesiology* 1999, 91, 1195—1208.
 92. Schutt, E.; Barber, P.; Fields, T.; Flaim, S.; Horodniak, J.; Keipert, P.; Kinner, R.; Kornbrust, L.; Leakakos, T.; Pelura, T.; Weers, J.; Houmes, R.; Lachmann, B. Proposed Mechanism of Pulmonary Gas Trapping (PGT) Following Intravenous Perfluorocarbon Emulsion Administration. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.* 1994, 22, 1205—1214.
 93. Keipert, P. E.; Faithfull, N. S.; Roth, D. J.; Bradley, J. D.; Batra, S.; Jochelson, P.; Flaim, K. E. Supporting Tissue Oxygenation During Acute Surgical Bleeding Using a Perfluorochemical-Based Oxygen Carrier. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996, 388, 603—609.
 94. Habler, O. P.; Messmer, K. F. Tissue Perfusion and Oxygenation With Blood Substitutes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000, 40, 171—184.
 95. Holman, W. L.; Spruell, R. D.; Ferguson, E. R.; Clymer, J. J.; Vicente, W. V. A.; Murrah, C. P.; Pacifico, A. D. Tissue Oxygenation With Graded Dissolved Oxygen Delivery During Cardiopulmonary Bypass. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1995, 110, 774—785.
 96. Cochran, R. P.; Kunzelman, K. S.; Vocelka, C. R.; Akimoto, H.; Thomas, R.; Soltow, L. O.; Spiess, B. D. Perfluorocarbon Emulsion in the Cardiopulmonary Bypass Prime Reduces Neurologic Injury. *Ann. Thorac. Surg.* 1997, 63, 1326—1332.
 97. Flaim, S. F. Medical and Therapeutic Applications of Perfluorocarbon-Based Products. *Red Blood Cell Substitutes*; Rudolph, A. S., Rabinovici, R., Feuerstein, G. Z., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1998; 437—464.
 98. Krafft, M. P.; Riess, J. G. Highly Fluorinated Amphiphiles and Colloidal Systems, and Their Applications in the Biomedical Field—A Contribution. *Biochimie* 1998, 80, 489—514.
 99. Lowe, K. C.; Davey, M. R.; Power, J. B. Perfluorochemicals; Their Applications and Benefits to Cell Culture. *TIB Tech.* 1998, 16, 272—277.
 100. Riess, J. R. Blood Substitutes and Other Potential Biomedical Applications of Fluorinated Colloids. *J. Fluorine Chem.* 2002, 114, 119—126.

(盛国立 张小红 译)

血液替代品：血红蛋白氧载体

Deanna J. Nelson

BioLink Technologies, Inc., Cary, North Carolina, U. S. A.

引言

异源输血是现代医学中挽救生命的重要手段之一，自1918年首次报道后^[1]，应用越来越广泛，到20世纪90年代达到了顶峰。现在，美国每年输入患者体内的袋装红细胞（RBC）已超过了1200万个单位，全世界的每年输血量至少有2000万单位^[2,3]。输入红细胞的主要适应证为贫血，能通过提高载氧量来达到治疗目的^[4]。

随着输血次数的增多，与此相关的危险逐渐为人们所认识。虽然早期输血后出现的溶血反应已经通过血液配型和杂交的方法基本得以克服，但是20世纪40年代早期发现的血液携带抗原传染疾病的问题还没有得到很好的解决^[5]。血液中的感染因素很多，诸如B/C型肝炎、人免疫缺陷病毒（HIV）1型和2型、人T-细胞淋巴瘤病毒（HTLV）1型和2型等。目前，供体血中这些致病因子得到了检测。但是血液中还可能含有一些没有检测的致病成分——细胞巨化病毒、Epstein-Barr病毒等疱疹病毒及细小病毒、细菌（如耶尔森氏杆菌）、寄生虫（如锥体虫），还有一些特征难以确定的病原物质，如库鲁病的病原体。

储存的RBC（红细胞）还有一些其他缺点：①血红蛋白由于缺少胞内受体物质（主要是2,3-二磷酸甘油酯）而对氧的吸附力增强^[6]。同时在储存过程中，细胞的三磷酸腺苷（ATP）部分丢失，造成RBC的不利变形使其在局部微循环血流中受阻，这就使得RBC的输送氧能力进一步减

弱^[7,8]。②会持续发生免疫原性反应，尤其是在多次异源输血后或输血量较大时更易发生^[9]。③已有一些研究表明输入RBC后机体免疫功能有所降低，如癌症患者在同源输血后存活年限减短、复发率增高、术后感染率增高等^[10~12]。

基于以上原因科学界集中了大量人力、物力开发血液替代品来代替异源血。对完全相容的“血”的迫切需求在很早以前就为人们所认识^[13]，时至今日则越来越重要。因为发现有局部缺血的情况（即血液尚未耗尽而供氧量已不足的情况），人们纷纷把注意力转移到载氧液体上来，因为在上述情况下明显不需要输血，需要输入载氧液体。所有这些因素再加上潜在的商业价值，一起促进了血液替代品的发展。

可是“血液替代品”这个词却是个不当用词。因为血液所具有的动力学特征、代谢作用、调节作用、凝结反应性以及免疫功能，是临床上输入的血浆增容液或电解液所替代模仿不了的，它们只能在失血后用于补充容积。血液的这些性质也是血红蛋白和血浆替代品全氟化合物这两类载氧液体所体现不了的，它们被用来代替血液中的红细胞。血液及其多样性成分在治疗上的作用将进一步增加，因此有必要实行自愿献血，进一步完善输血治疗方法以满足临床治疗的需要。

本章将主要综述治疗性血红蛋白，即正在开发的、用于辅助血液载氧的、基于血红蛋白的氧载体。讨论的重点是携氧、释氧的液体，本章将不讨论血浆增容剂（如白蛋白、右旋糖苷、明胶及羟乙基淀粉）和电解液（如乳酸林格氏液），这些液体的部分性质比较见表1。

表1 血液、血液替代品和增容剂性质的简略比较

性质	血液	血液替代品	增容剂
容积扩张	是	是	是
携氧能力	是	是	否
其他治疗用蛋白	是	否	否
治疗期	1~2个月	1~2天	数小时（依剂量和种类而变化）
储存期	1个月	6~24个月	2年
储存中的变化	是	否	否
特定类型	是	否	否
病毒灭活	否	是	是
大小	大	小	小
黏度	高	低/适中	低

历史回顾

一个世纪以前,人们发现红细胞(RBC)中的血红蛋白(Hb)是血液中的载氧工具^[14],因此一直以来将血红蛋白制剂作为血液替代液的主要成分进行评价^[15]。

人血红蛋白是一种典型的哺乳动物血红蛋白,是由两条 α 链和两条 β 链的多肽亚基组成。每个亚基均包含一个亚铁血红素修复基团,由一个卟啉环和一个铁离子配体组成。Hb形式的血红蛋白具可逆结合氧的能力,铁离子呈+2价氧化态,并且被卟啉环包埋在蛋白内。当亚铁离子被氧化成+3价铁离子时,此时的Hb为高铁血红蛋白(metHb),不具有结合氧的能力。人Hb分子质量约为64 500Da,接近于另一个广泛研究的哺乳动物胎牛血红蛋白Hb的大小^[10~12]。

然而用以往制备的Hb溶液所获得的无对照的实验结果,只能说在某种程度上令人鼓舞,因为纯化的Hb通过静脉灌注后明显很迅速地被肾过滤,且并不能有效地释放氧气到组织中^[16]。这是因为Hb一旦离开红细胞则由四聚体分解为二聚体,容易通过肾小球过滤。不能有效释氧归根结底是因为纯化所得的这种二聚体Hb采取了不同于红细胞内部Hb的构象,它对氧的吸附能力更强。人红细胞内有高浓度的2,3-二磷酸甘油酯(2,3-DPG),一种有机多聚阴离子,它能结合到Hb上使其结合氧的能力下降,从而有效释氧。很遗憾的是,2,3-DPG很容易在储存过程中水解或在纯化过程中丢失。

从以往人源Hb纯化的实验结果中可以得出这样的结论:Hb必须被修饰才能在临床上发挥更大的作用。一般而言,Hb修饰有两个目标:一是降低其对氧的吸附力;二是延长其在静脉内的停留时间。除此之外再无共识。历史上,要求血浆增容剂高度亲水、无毒性、无抗原性,胶体渗透压和血液相近,黏度能适应各种生理条件,能进行生物降解或被排泄,同时还要有足够长的半衰期^[17]。此外,Hb不能导致排斥反应,需具免疫惰性,不激发凝集反应,不激发补体系统,不激发的同时也不抑制机体抵御系统^[18]。然而,这些性质并不足以定义具有最优氧结合力和相对分子质量的治疗性Hb。另外还有一些较为模糊的标准,包括载氧力和胶体渗透压的合适平衡,静脉内有效Hb的滞留和氧化态Hb的代谢的相应平衡。目前尽管已经认识到氧化态Hb超过10%将会减少组织的氧合作用,但就机体对氧化态Hb的最大耐受程度还没有达成共识。

另外,以往的Hb溶液实验结果备受质疑,因为所谓纯化的Hb事实上并不是很纯。Hb样品中还含有其他物质,一个常见的杂质是叫做“基质”的红细胞血浆膜质。这种基质是,至少部分是输血后肾毒性的原因^[20],因此必须从Hb制剂中去除,而且在严格去除基质时,也能去除血型抗原物质,这样在输血时可以省去血液配型的麻烦,纯化Hb制剂可以用于任何患者。

Hb溶液经常遇到内毒素污染。以前生产内毒素含量低

的Hb已经证明是很有挑战性的,一部分是因为大量早期工作是在实验室完成的,实验室工作人员并不熟悉制药工业中使用的防止微生物污染的生产流程。还有报道说,Hb能与内毒素结合,所以一旦被内毒素污染很难完全将其去除^[21]。综上所述,必须仔细设计Hb溶液的生产流程,防止引入内毒素。

正在开发的治疗用 Hb

1. Hb 来源

适合修饰的Hb既可以从自然界获得,也可以通过生物技术手段获得。目前,从可获得量的角度考虑,哺乳动物红细胞来源的Hb最为有用。因为在哺乳动物红细胞中,超过90%的蛋白为Hb,而且这些Hb蛋白很容易通过裂解胞膜的方法获得。商业上的红细胞来源Hb是从人或牛红细胞中分离得到的。

从哺乳动物的或储存的红细胞中分离得到的Hb都可以作为来源。红细胞在储存时,其胞膜最先发生退化,而细胞内的Hb质量并不发生改变^[22]。这样,从过期的红细胞中获得的Hb质量仍很高。因此,红细胞除了已灌注使用外,不论新鲜与否均可作为Hb的来源。

基因工程手段使得Hb既可以通过微生物生产,也可以通过转基因动物和植物来生产^[23]。一种突变交联型Hb已由大肠杆菌(*E. coli*)大量表达^[24],酵母Hb表达系统也已有报道^[25],而人的Hb已经在小鼠和猪体内高水平表达^[26]。很明显猪是商业上大量获得Hb的合适宿主。

2. 修饰 Hb 的种类

目前,在开发的修饰Hb可以分为四类:①交联Hb;②聚合交联Hb;③偶合交联Hb;④以上三种的组合,即偶合聚合交联Hb(图1)。

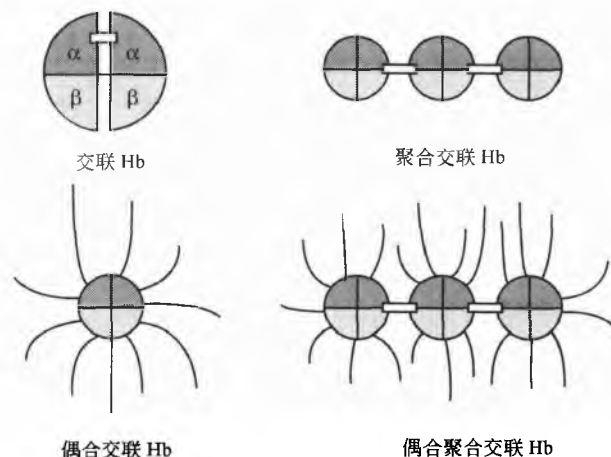


图1 修饰的Hb类型

可以通过化学或基因工程方法对Hb的亚基进行分子内交联。例如,用多阴离子交联剂DBBF双(3,5-二溴水



杨酰)反丁烯二酸(双阿司匹林)或2-去甲酰-吡哆醛-5-磷酸(磷酸吡哆醛)可以使 β -亚基在DPG结合位点上发生选择性交联。如果该DPG结合位点被惰性多聚阴离子填充,Hb就有可能选择性地 α -亚基的Lys-99残基的 ϵ -氨基之间发生交联,如双阿司匹林交联血红蛋白(DCLHb, Baxter)。另外,也可以通过插入合适的DNA片段使得表达的Hb在 α 亚基氨基和羧基末端发生分子内交联。这些分子内交联的Hb其相对分子质量和结构都类似于其天然形态。

血红蛋白也可以与多种聚合物交联,包括单甲基聚乙醇(MPEG)、右旋糖苷和菊粉。当聚合物是单官能团,即只有一个活性基团可与Hb反应时,偶联才是特异性的。然而,一个Hb上常连接有多个聚合物链。连接通常只发生在蛋白表面Lys残基的 ϵ 位上,尽管其他氨基酸(如His、Arg、Cys、Tyr)已使用特殊反应条件或由特殊试剂修饰过。正因为修饰发生在表面,这类修饰的Hb有时被称作“装饰的”Hb,其相对分子质量大小取决于偶联的多聚物的分子个数和相对分子质量。如果偶联剂中污染了含有多个活性基团的前体物质(如MPEG可能被污染),终

产物中会含有部分的多聚Hb。

相似地,Hb可被多种试剂聚合,使用最广泛的是戊二醛。其他的聚合剂包括氧化腺苷、氧化棉子糖和双功能活性的PEG。典型的聚合剂是双功能的,有两个反应位点,连接于蛋白表面Lys残基的 ϵ 位上。经聚合修饰后,2~10个Hb分子线性连接在一起形成聚合物。使用短链的聚合剂时,尽管也有一些分支,但主要产物是线性聚合物。在聚合时,Hb表面也会被聚合物修饰,终产物是修饰后多聚物的混合物,其相对分子质量可能和天然Hb相近,也可能达到天然大小的10倍(更大的分子不稳定且容易聚集沉淀)。

最后,还可以综合以上三种方法来修饰Hb。例如,可以将人Hb先进行分子内交联后再和另外的大分子偶联,或者先分子内交联再聚合(虽然几种方法先后可以颠倒,但是先进行分子内交联可以使四聚体Hb得到进一步的修饰)。

图1和表2为生产上供临床实验的治疗性Hb所采用的各种方法。

表2 正在商业开发的产品及其潜在的临床应用

公司	修饰的Hb	临床的研究焦点
Apex Biosciences Inc. (USA)	PEG-偶合人体Hb	败血症性休克
Baxter Healthcare Corp. (USA)	修饰的rHb	没有近期的试验 ¹⁾
Biopure Corp. (USA)	戊二醛聚合Hb (HBOC-201 或 Hemopure™)	外科手术
Enzon Corp. (USA)	PEG-偶合Hb	辅助放射治疗
Hemosol (加拿大)	氧化的棉子糖-聚合和交联人体Hb (α -Raff-Hb 或 Hemolink)	整形或心脏外科; 慢性肾衰竭作为红细胞生成素的辅助物使用
Northfield Laboratories (USA)	吡哆醛, 戊二醛-聚合人体Hb (PolySFH-P 或 Poly-Heme)	外伤, 外科手术

1) DCLHb的开发,一种分子内交联的人体Hb,在1998年中断。

3. 制剂

修饰Hb经常加到人血浆等渗电解液中,典型的Hb浓度为5%~15%,常用的体系是磷酸盐缓冲液、林格氏生理乙酸盐溶液和乳酸林格氏溶液。碳酸盐缓冲液也有报道^[27]。

为了提高治疗用Hb的储存稳定性,已经研究了其他一些添加剂尤其是抗氧化剂的作用^[28]。然而并不是所有的还原剂都能还原Hb,相反,有的还可能氧化Hb。如两种常用的药物抗氧化剂抗坏血酸盐和谷胱甘肽是脱氧Hb溶液有效的抗氧化剂,但是当Hb处于氧合态时,它们却充当了氧化剂。有的抗氧化剂或还原剂不适合用于治疗,有的在生理pH范围不起作用,有的在起抗氧化作用的浓度下有毒性。

已经研究用脂质体或聚丙烯酰胺纳米颗粒包裹来提高Hb浓度而不改变其低膨胀压,延长其在循环中的停留时间,并且减少Hb直接暴露于细胞和机体组织。至今Hb包埋方面所取得的成功很少。早期脂质体包裹Hb(LEH)的研究主要有如下缺点:免疫系统抑制、补体激活、内毒素污染、

脂质体包埋Hb浓度低(1~2g/dL)^[29]。近年来该项研究更多得益于脂质体包埋技术在其他领域的进展^[30]。尽管包埋效率低的问题仍然存在,几家单位已经演示了改进的包埋技术^[31],用PEG修饰脂质体表面可能会降低内皮系统的识别和吸收,从而进一步延长LEH在循环系统的停留时间^[32~36],而防止氧化或增进metHb还原的共包埋技术则可以延长功能态的oxyHb的循环时间^[37]。最后,人们还意识到PEG修饰还可以加大到达癌组织药物的剂量,这样LEH就有可能用于该领域,也可以用于急救^[38]。

4. 包装和储存

修饰的Hb长期保存不稳定,Hb会逐渐氧化成metHb。相反,当和一氧化碳完全结合或者脱氧保存时,则不论天然态Hb还是修饰Hb都异常地稳定。脱氧血红蛋白一旦暴露在空气中则迅速被氧化。于是,多数公司都将治疗用Hb脱氧保存。另一种方法是将氧化态Hb溶液冷冻保存,-80℃长期稳定,同时可以作蛋白冻干并在使用时重新溶解。

虽然玻璃器皿非常适合用于包装蛋白,但是最常用的

容器却是乙烯-乙酸乙烯共聚物(EVA)类的软塑料。塑料包装材料必须仔细选择。和其他蛋白质一样,血红蛋白是亲脂的,易于萃取出小分子的亲脂底物,如聚氯乙烯容器中的增塑剂。

5. 商业生产相关技术

用哺乳动物红细胞为原材料生产修饰的 Hb 时,要尽量去除血浆蛋白和基质。因此一些厂家采用了如下流程:冲洗细胞以减少残留基质的污染、有限裂解、仔细滤除溶血产物、超滤等。还有的厂商把色谱纯化步骤也加入到流程中。已发表的数据显示,不论采用怎样的流程所获得的“无基质”Hb,其磷脂成分都很少($<2\mu\text{g/mL}$)^[39-41]。

用哺乳动物红细胞为原材料,商业化生产修饰的 Hb 时,第二个问题是在生产流程和产物中如何避免被内毒素污染。内毒素一旦引入生产流程,就很难去除,它会导致热原反应或者更严重的副反应。已有几种色谱方法用于去除内毒素(如 DEAE-sapharose 和商业化的吸附树脂如 Detoxigel™、Acticlean Etox™),但它们的有效性还没得到很好地证实^[42],不一定能完全清除商业化规模生产的 Hb 的 LAL-反应活性。

另一个与人血相关的微生物纯度问题是病毒病原体的污染。若使用动物血液,可能会含有病毒和动物致病因子,这些病毒谱已经被鉴别,那么很有可能将动物病传染给人类^[43]。因此除了要小心控制用于生产 Hb 的血液外,在制备 Hb 溶液时还要采用严格的病毒灭活和去除手段,以防止疾病传染。

基因工程生产治疗用 Hb 时有三个挑战:首先,生产规模本身就是一个很大的挑战;其次,是表达系统的局限;最后,必须去除细菌内毒素和热原。

虽然基因工程在微生物体系内成功表达的蛋白产量每年达数吨,但远不能满足商业上每年治疗用 Hb 数千吨的需求。因此,提高生产能力以满足商业需要将是最大的一个挑战。

提高目标 Hb 的表达效率是治疗用 Hb 生产的第二个挑战^[44]。目前生物工程技术在用微生物表达必需球蛋白的同时,还在亚基上插入了血红素(在培养基上加入从牛 Hb 中分离的血晶素以产生适量的血红素)。在许多表达系统中,还在重组 α 、 β 链氨基端加上一个甲硫氨酸。已知 α 、 β 链的氨基端的缬氨酸在调解氧吸附力方面起着重要作用,还和变构因子有相互作用及波尔效应等。因此 N 末端的改变不仅会改变重组 Hb (rHb) 的构象,还会影响到其功能。Ho 已经报道说大约有 25% 纯化的 rHb β 链血红素基团不能形成正确的构象^[45]。提高内源性血红素的产量能否减少这种错误构象还不清楚。目前通过微生物合成的血红素还不太有效,不允许在商业上应用。

最后,如果用大肠杆菌(*E. coli*)来生产 Hb,那么纯化要求将非常苛刻。去除所有的非 Hb 蛋白和内毒素将是极为严格的要求,因为后者脂蛋白为热原。为实现这个目标,需要采用多种色谱纯化的方法。

开发实用的修饰 Hb 溶液时,还有几点必须要进行说明。蛋白容易氧化,要保持携氧活性,血红素上的铁必须为+2 价氧化态。因此生产和长期储存 Hb 都要尽量避免 metHb 的形成。这有许多方法,常用的是在生产时尽可能降低温度。另外一些方法是将 Hb 暴露于特别不利的环境中进行脱氧或羧基化,待生产过程结束后再将其复原成含氧态。

不管采用什么方式生产治疗用 Hb,都应遵守 cGMP 规范。

潜在的治疗用途

许多历史上基于 Hb 的氧载体的安全性和有效性的期望已被人们所认识,这些蛋白越来越被认为是具有治疗作用的血红蛋白(tHb)。使用 tHb 时不需血液配型,而且很明显地不会激发机体补体级联反应和免疫反应^[46](不过在准备灌注来源于牛的 Hb 之前需要进行抗体检测)。

目前一代用于治疗 tHb 溶液(表 2 和表 3)应具有如下性质:能运输氧气、重新分配血流和维持血管容量等。载氧能力可能是源于 Hb 以下三个特性:①还原态血红素基团有良好的氧结合特性;②非细胞 tHb 要小于红细胞内的 Hb;③一些 Hb 溶液的黏度低。由于以上一些特性,tHb 就可以被灌注到微毛细血管区。在这里红细胞则受到限制而无法灌注。这些特性使 tHb 在下列临床适应证中具有应用前景,首先将介绍三种主要并广为接受的适应证,然后介绍其他有关 tHb 推测的用途。

表 3 在这篇综述中使用的首字母缩略词

治疗用 Hb	生产厂家	首字母缩略词
吡哆酸, PEG-偶合 Hb	Apex	Hb-PHP
分子内双交联人体 Hb	Baxter	DCLHb
戊二醛聚合牛 Hb	Biopure	HBOC-201
PEG-修饰牛 Hb	Enzon	PEG-Hb
氧化的棉子糖-聚合和交联人体 Hb	Hemosol	o-Raff-Hb
吡哆酸, 戊二醛-聚合人体 Hb	Northfield	PolySFH-P

1. 急性整体缺氧的缓解

用来运输氧气以维持生命的唯一胶体血浆增容剂是 tHb,而不是血液本身。总之,对一系列失血休克的动物模型进行的临床前研究,结果表明 tHb 溶液能恢复平均动脉压(MAP),改善组织氧供,并有效缓解碱不足和局部失血引起的酸解,使接受 Hb 制剂的受试动物的生存率得以改善。相反电解质溶液(如 Ringer's Lactate)和胶体溶液(如不均一淀粉和白蛋白)没有那么有效^[47-50]。关于将 tHb 制剂用于治疗,人们开展了非常广泛的研究,包括用灌注 tHb 代替输入血液或红细胞,或者用于血液稀释。



1.1 救治急性血容量减少或失血性休克

在抢救急性血容量减少或失血性休克时，灌注 tHb 的临床症状是有血液输入，这是 FDA 认可的三大类临床指征之一^[51]。评价多聚人 Hb、PolySFH-P (Poly-Heme; Northfeild) 有效性和安全性的临床试验还在进行中。关于它们在缓解急性整体缺氧方面安全性和有效性的评估，要等到患者入组完成，严格的、多方面的分析都已完成时才能揭晓。因此很难推测什么时候才能证实这些基于临床前试验结果的预言。

前期报告指出 tHb 可能用于救治外伤或意外失血，此时灌注 Hb 溶液可以迅速缓解失血。在这种情况下，tHb 是灌注的桥梁：在急诊室、康复室、手术室或监护室中灌注积累的数据，使得对随后输血的生理需求能进行更广泛地评估。

例如，近年来有报道讨论将 PolySFH-P 当作复苏液体应用于临床的急性创伤或紧急手术中，如主动脉搏修复术、肝切除术、门体循环分流和髂关节置换术^[53]。44 个平均创伤严重度评分为 21 ± 10 的外伤患者，随机分组，给 23 个患者输入红细胞作为对照组，21 个患者接受了 6 个单位 (300g) 的 PolySFH-P 作为初始的血液替代品。在双盲情况下，研究者根据患者临床表现、症状、实验室数据和临床状况做出输液的决定（对手术前和手术中清醒和麻醉的患者使用 PolySFH-P，只限于在失血阶段使用）。在输液前、输液结束时、结束后 12h、1d、2d 和 3d 分别取样，需要测量生命征象（体温、血压和心率）、肝功能 [天冬氨酸转氨酶 (AST)、丙氨酸转氨酶 (ALT) 和胆红素]、淀粉酶和肾功能。

对 PolySFH-P 灌注及随后的一系列监测过程中，没有发现与 PolySFH-P 有关的严重的安全性问题及副反应。值得注意的是，输入 4.4 ± 2.0 单位的 PolySFH-P 后，可观测到血浆 Hb 为 $(3.9 \pm 1.3) \text{g/dL}$ ，约为总循环 Hb 的 40%。灌注 1.5d 后，血浆 Hb 浓度降至 $(2.2 \pm 1.3) \text{g/dL}$ ，灌注后 1d、2d 和 3d 时，血浆 Hb 分别降至 $(1.4 \pm 0.9) \text{g/dL}$ 、 $(0.6 \pm 0.6) \text{g/dL}$ 和 $(0.3 \pm 0.3) \text{g/dL}$ 。输入 PolySFH-P 并没有引起组间的体温、平均动脉压、心率和肌酐差异，也没有出现对血管的作用、肾功能不全或发热。在灌注后第三天观测到总胆红素浓度在 $(2.4 \pm 1.7) \text{g/dL}$ 范围内增长，除此之外其他功能检测没有异常之处。灌注后 1d 和 3d 时，对照组输入的外源红细胞总量远远大于实验组。灌注 3d 后，所有的 PolySFH-P 都从体循环排出，研究者输入的红细胞可以满足患者对氧的进一步需求。

II 期试验治疗严重失血时，PolySFH-P 的灌注量高达 10 个单位 (500gHb)^[53]，早期结果 (17 个患者) 显示了安全性。正在此类 15 个中心进行的 III 期试验旨在考察灌注 PolySFH-P 对大动脉瘤手术的治疗作用。

一种分子内交联的人 Hb-DCLHb (Baxter) 正在进行试验，以期能达到减少或避免手术后输血的目的。1500 多名在接受心脏手术的患者入选了这项研究，其中 209 人需

要手术后灌注，符合该项研究入组/剔除的标准，并签署了知情同意书。将患者随机分配，术后 24h 内，一部分接受 3 个单位 (总量为 750mL) 10% 的 DCLHb，另一部分接受 3 个单位的 RBC。后期患者可根据需要继续接受灌注或其他治疗。手术当天，59% 的曾接受 DCLHb 的患者不需要灌注 RBC。手术后 7d，19% 曾接受 DCLHb 的患者已完全不需要灌注 RBC。手术后 2d 内，DCLHb 组患者平均需要灌注 RBC 单位数远低于对照组 ($P < 0.05$)。此后两组对 RBC 的平均需求单位数没有明显区别。值得注意的是，DCLHb 在患者体内有很好的耐受性，且两组的发病率和死亡率无明显差异。

在另外两个分别开展于美国和欧洲的试验中，对外伤和失血性休克患者使用 DCLHb，作为液体、血液、手术干涉的辅助剂以提高氧输送量。1997 年 2 月至 1998 年 1 月由美国 18 家创伤中心发起的多中心、随机可控、单盲的试验中，若假定或已经证实患者正在出血并伴有持续血流灌注不足，则给患者使用 DCLHb 或生理盐水溶液 (对照)^[55]。尽管该研究对入选前使用液体或血液方面没有限制和其他干涉，但一经入选，在首次满足入组标准后 30min 且入院 60min 内，患者必须在研究医院输入 500mL 治疗溶液，接受上述治疗后仍满足入组标准且病情严重的患者，须在 1h 的灌注阶段继续输入 500mL 的治疗溶液。试验的主要目标是利用 DCLHb 将创伤和失血性休克患者的 28d 死亡率从 40% 降至 30%，即降低 25%，同时必然伴有 28d 发病率和 48h 死亡率的降低。24h 乳酸水平也会由原来的碱值不足 (多于 15mEq/L) 恢复正常。在 1998 年早期美国这样研究终止之前，112 名参加的患者中 98 人 (88%) 输入了 DCLHb 或盐水溶液。28d 时，DCLHb 组的 52 名患者中 24 个 (46%) 死亡；盐水溶液组的 46 名患者中 8 个 (17%) 死亡 ($P = 0.003$)。48h 时，DCLHb 组 24 人 (46%) 死亡，盐水溶液组 7 人 (15%) 死亡 ($P = 0.01$)。DCLHb 组由多器官功能障碍度评分 (multiple organ dysfunction score) 进行评估的 28d 发病率比另一组高 72% ($P = 0.03$)，副反应发生率 (adverse event rate) 和乳酸水平没有差异。亚组分析 (subgroup analysis) 和协变调整 (covariate adjustment) 并没有改变死亡率的不平衡性，同样多器官功能障碍度评分和 24h 乳酸清除终点 (24-h lactate clearance end point) 也不能说明 DCLHb 作用是有益的。这项研究的负责人指出，DCLHb 组的死亡率较高，部分导致发病率和灌注标记物改善的缺失从而限制了使用这两个临床指标独立地评估发病率。值得关注的是，研究组认为并不能确定一定是由 DCLHb 引起了发病率的不平衡。基于数据检测委员会的建议，发起者于 1998 年 3 月 17 日终止了该项研究。几个月后的欧洲同时进行的研究也终止了。

1.2 治疗用血红蛋白在手术期间的应用

维持血液供应量的技术不只是用 tHb 替代血液，通过自体供血或手术期间的血液再利用，还要在手术中尽量减少对外源血的需要。评估两种聚合 Hb 的后期 II 和后期 III

临床试验正在进行中。

多中心临床完成的Ⅱa期试验中,在18名患者整形手术(髌关节置换术)前输入500mL o-Raff-Hb(Hemosol,一种氧化棉子糖聚合人Hb)以稀释血液,未发现不良反应^[56]。心脏手术患者中的一个类似试验也即将完成。

有4个报告总结了高度聚合的13g/dL HBOC-201的纯化牛血红蛋白(Biopure)溶液,用于稀释血液的临床试验结果。第一份报告是用低剂量的HBOC-201(ca. 0.4g/kg)用于13位患者腹部大动脉修复手术前的稀释^[57]。第二份是将其用于12位患者的肝脏切除手术过程中^[58]。在实施麻醉、从患者体内取1L鲜血并用1L或2L的RL溶液稀释后,将患者随机分组,30min内接受3mL/kg剂量的HBOC-201或6%的羟乙基淀粉(HES),手术前、手术当天、术后2d、3d、7d及出院当天、出院后2d、3d、4d和术后3个月时,须接受血液化学、共氧法(*co-oximetry*)、血液学、凝固特性和免疫学检查。手术时要监测的变量包括损伤动脉和肺动脉压和动脉及混合静脉血气(arterial and mixed venous blood gas)。利用标准方程计算心脏指数(CI)、全身和肺血管阻力指数(分别为SVRI和PVRI)、氧运输指数(DO₂I)、氧耗量指数(VO₂I)和氧提取率(O₂ER)。

总体而言,试验结果显示低剂量单次使用的HBOC-201具有很好的耐受性。然而,与HES组患者相比,在HBOC-201刚注入患者体内时却发现MAP和SVRI逐渐升高,CI显著下降,而在注射过程结束后的大约30min,这种变化达到了极大值。研究人员已经预料到组织充氧提高的迹象,因为大动脉氧含量在增加,DO₂I大于或保持原有水平。然而,CI变化太大足以抵消这种增长趋势。因而作者得出结论,3mL/kg剂量的HBOC-201不足以提高血液的载氧力。

基于研究人员的建议,两项随后的研究评估了加大的剂量^[59]。在实施麻醉、采集1L血并注入1L RL溶液后,将24名患者(每组12人)随机分配,在30min内,接受6.9mL/kg剂量的HBOC-201或9.2mL/kg 6%的HES(注射Hb的剂量分别为0.9g Hb/kg或1.2g Hb/kg),然后再给患者注射500mL的RL溶液以维持血管容积。像以前一样,将与患者有关的全身和肺部动脉压及血管和混合静脉血气用来计算血液动力学和氧运输指数。手术前取出用于稀释的自身血液在手术中主动脉松开后进行再灌注。

这两项研究和先前的研究一样,注射HBOC-201引起SVRI(121人中占71%)和PVRI(70人中占53%)相当大的增长,没有检测到对大脑血液动力学的相关影响^[60]。用HBOC-201稀释血液可以使血浆Hb浓度高达3g/dL,这个浓度足够维持动脉氧容量远远高于用HES稀释所得值。但是这种优势(大的载氧能力)会被增加的SVRI和PVRI以及由此引起的CI指数的大幅度的降低所抵消。尽管氧摄取增加可以维持机体耗氧,但在没有证据表明组织氧合作用增加的情况下,氧耗增加被看成是对氧运输能力降低的补偿性反应,而不是释氧增加的标记。使用低剂量或临床相关剂量的HBOC-201进行血液稀释,在血液动力学和氧

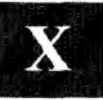
运输方面并不比HES有明显的优势。

不含细胞的Hb可以改变红细胞的脆性,储存细胞装置的液气界面的剪切力可以改变tHb的结构,关于这两点必须进行完整地研究才能在手术期使用tHb。最后从健康志愿者身上采16单位的水置CPD溶液中保存,并用HBOC-201(1500mg/dL; N=10)或生理盐水(同等容积; N=6)稀释^[61]。自动的术中血液回收是通过吸液泵将血液抽到自身血液回收系统的容器中,并处理得到的血液来模拟人体血液循环的(这套设置是用手操作的,因为离心机中监测红细胞和上清液界面的光学传感器对上清液中牛的Hb的红色敏感,能过早和不适当地引起清洗循环)。分析样品,得血浆血红蛋白的浓度和相对分子质量分布和红细胞形态,接下来处理并进行洗涤。五个单位的HBOC-201进行第二轮1000mL的洗涤。作为处理的结果,血浆Hb的单位HBOC-201浓度从处理前的(1311±265)mg/dL降至后来的(27.8±19.6)mg/dL[再处理一次将使Hb的血浆浓度降低至(6.5±2.2)mg/dL]。处理前和处理后接触HBOC-201都不会改变红细胞或血小板的形态,并且处理含HBOC-201的溶液不会改变红细胞的脆性。

作为心脏手术的一部分,用心肺分流术进行tHb的血液稀释为保存自身血液提供了更多的机会。在分流开始时,通过静脉血管采集一部分的自身血液,并储存在另外的容器中。同时,注入tHb溶液以替代抽出红细胞的体积和携氧能力。因此,手术中的失血会失去较少的红细胞,从而使自身红细胞得以保存。心肺分流术结束后,将储存的有凝集功能的自身全血输回体内,可以降低对异源血的需求。另外,在分流前储存一部分自体血利于保存血小板功能。

Neya和他的同事研究了分流环境中HBOC-201的性质和稳定性^[62]。一种受试制剂由HBOC-201溶液和生理盐水进行等比稀释而得;另一种是将500mL血加入500mL生理盐水并与1L HBOC-201溶液混合而得。每种试剂各2L,加热至37℃,在两种心肺分流模型中进行评估:一种是有完整容器的气泡氧合器(BO, n=5制剂);另一种是膜氧合器/静脉心脏切开术容器(MO, n=5制剂)。取50mL稀释的HBOC为样品,在分流循环中氧合3min,37℃保存5h,作为对照使用。在5h的试验中,用2L/min维持持续回路的体外循环。分流30min后及每过1h取样,以测定tHb、metHb、血浆Hb的体积排阻色谱和氧结合行为以及灌注液pH(常需要加入碳酸氢盐以维持生理pH)。试验过程中Hb的浓度没有改变。但是所有不含RBC组的MetHb含量均增加了,并且对照组初始值为3%而当5h试验结束时,其值为22%~28%。大多数分流手术所需时间为2~3h,在循环2~3h后,这些HBOC-201溶液中metHb的含量为15%~20%,正如McGown和他的同事发现的一样^[63],RBC可以显著降低Hb的氧化程度和氧化率。有红细胞存在时,循环2~3h后,血浆metHb含量为8%~10%,试验结束时为12%。正如人们所料,metHb含量的增加导致tHb的P₅₀值下降^[64]。

总而言之,用tHb来治疗急性血容减少和伴随外伤或



手术发生的全心失血的效果不能令人满意。在写本章时有报道称,当 DCLHb 或 PolySFH-P 小体积用于手术时,耐受性很好,且注射 tHb 能减少输血需求量,而当体积增大时,只有 PolySFH-P 显示对症状可能有作用。在一些试验观察到较高的死亡率后,DCLHb 停止了开发。

tHb 用于血液稀释的临床试验还在继续。如果能对大多数患者有疗效,那么就有理由期望能得到批准并最终用于临床。

2. 血液动力学正常化和败血病组织氧合作用

败血病及其并发症——高血压、休克、多器官功能障碍综合征占了住院患者死亡率的很大一部分^[65]。最近对败血病啮齿类模型动物研究表明灌注储存的红细胞并未提高病鼠组织的氧合作用^[66]。还有的研究组用许多种败血病模型动物来测试 tHb 溶液的作用^[67~69]。下面将描述用特定 tHb 所做的试验。如果血液动力学和组织氧合的恢复是临床上治疗败血病的关键,那么灌注其他的 tHb 将会得到类似的效果。

Hb-PHP (Apex) 治疗败血病的安全性和疗效还处于临床试验中。在 I / II 期开放、剂量爬坡研究中,对由败血病及疑为败血病继发起的容积顽固性、血管加压药依赖型的患者,在 30min 时间内注入大剂量的 Hb-PHP (25mg/kg 体重、50mg/kg 体重或 100mg/kg 体重),从而观察心血管的变化及有无副反应^[70]。发现 Hb 灌注耐受性很好,使血压降低的同时也维持了 MAP 水平的上升。在此剂量水平上,未发现对肺、心、肾、肝等器官的副作用。Hb-PHP 灌注还提高了 SVR,降低了 HR。这些结果促进了将 Hb-PHP 用于败血症的进一步研究。

随后进行的 I / II 期研究中,加大剂量并延长给药时间,对由败血病或疑为败血病继发起引起休克的患者输入 160mgHb/kg 体重、320mgHb/kg 体重、640mgHb/kg 体重或 2560mgHb/kg 体重的 Hb-PHP^[70]。起始给药速率为 10mg/(Hb · kg · h),以每 15min 增加 10mg/(kg · h) 的速度增至最大速率,低、中等、两个高剂量分别为 20mg/(kg · h)、40mg/(kg · h)、80mg/(kg · h)。应用高剂量时,如果休克得以缓解 [即不使用血管加压药而 MAP > 70mmHg (1mmHg = 1.333 22 × 10² Pa,下同)],则停止给药。滴定时的给药速率由血液动力学效果决定 (即保健指南的标准为 > 70mmHg)。同样机体对输入 Hb-PHP 有很好的耐受性。输入 Hb 后可观察到 MAP 和 SVR 增加,这使对血管加压药的需求量减少。该结果证实容积顽固性、血管加压药依赖型的患者中,Hb-PHP 可用来治疗全身炎症反应综合征 (SIRS) 引起的休克。III 期的关键试验正在计划中。

相似地,一项前瞻性、可观测的研究^[71]评估了分子内双交联人体血蛋白 DCLHb (一种分子内交联的人 Hb; Baxter) 在 14 名重病患者体内的血液动力学效应。所有患者都需要使用血管加压药进行治疗以维持足够的 MAP,且使用 DCLHb 前,都存在继发性器官功能障碍。研究人员

决定放弃 100mL 的 DCLHb 而使用最大量 500mL。每次输入间隔 60~90min。对血液动力学参数、去甲肾上腺素、收缩需要量 (inotropic requirement)、动脉和静脉混合血气以及尿排出量进行监测,服用 DCLHb 前及多次服药后 72h 进行生化 and 血液分析。评价 DCLHb 作为血管加压药药效的主要终点值为 MAP 保持其注射前值,且减少对去甲肾上腺素的需求量。已经达到了这个目标,对去甲肾上腺素需求量的减少分别维持了 24h、48h 和 72h (所有时间点 $P < 0.01$)。因此即使是预期生存情况非常不乐观的重病患者,DCLHb 的效果也不错。

3. 用作癌症治疗辅助剂

tHb 的局部作用包含了 FDA 认可的三大类适应证的第二类^[51]。例如,在癌症治疗 (如辐射、化疗) 的同时配合使用 tHb 将对患者产生两种潜在的好处:其一,癌症患者经常贫血,而贫血已被看成是一个重要的预后性征状因素。提高 tHb 至正常水平可以改进预后和治疗结果^[72,73];其二,tHb 的体积小 (相对于红细胞) 和良好的携氧能力有可能促进癌组织的氧化,而氧化已被认为和辐射或化疗后癌细胞的死亡或延缓生长有关,而且 Hb 可能是造血作用中血红素的来源 (见下)。

尽管没有临床研究的相关数据,但对啮齿类动物模型进行临床前研究表明使用 tHb 有许多益处。例如,在一项研究中,使用两种有实体肿瘤的啮齿类动物为模型进行研究,监测 PEG-Hb 对肿瘤氧合和对化疗反应的效果^[74]。给患 13762 乳房癌的大鼠输入 6mL/kg (360mg/kg) 剂量 6g/dL 的 PEG-Hb 溶液后,立刻测定组织的氧合情况,肿瘤组织缺氧的情况立刻得到改善,尤其当动物接触含氧丰富的空气时。服用环磷酰胺、美法兰、紫杉醇或顺铂等化疗试剂 24h 后,可以观测到同样的结果,而一般情况下这些试剂会导致肿瘤组织严重缺氧。同样,给患 EMT-6 鼠类乳房癌的小鼠服用 6mL/kg 剂量的 PEG-Hb 后,立刻同时服用环磷酰胺、阿霉素、5-氟尿嘧啶、双氯乙基亚硝脲或紫杉醇,每一个 3~5d 的治疗 (取决于化学试剂) 增加了杀死肿瘤细胞的效力,抑制了肿瘤生长,增加了转移性疾病的响应而不改变对脊髓的毒性。监测集落刺激活性的改变可以得到此结论。总之,作者认为把 PEG-Hb 作为肿瘤治疗的携氧剂的研究一定会成功。

一个平行性研究发现在大鼠乳房癌模型中,输入 Hb 溶液可以改善缺氧并增加对放射的反应^[73,75]。

除了以上三种应用外,更多的探索性研究正在考察将 tHb 用于临床上非血液治疗的适应证的可行性。下面是几个例子。

4. 支持造血作用或促红细胞生成素

造血作用是产生红细胞的过程,发生于骨髓内。通过一系列复杂的调控事件后,干细胞分化成多种类型的细胞,其中包括红细胞。外来刺激可引起干细胞的分化,并通过正调节再补给细胞数量。然而只有很少的治疗方法 (如铁、

X

水晶素、红细胞生成素)能促进含 Hb 的红细胞的形成。因为铁化合物、水晶素等物质生物利用度低,且 tHb 的安全性与不经修饰的 Hb 相比得到改善,因此早在 20 世纪 20 年代就有人想到用 Hb 来激发红细胞的形成。下面描述的是用特定的 tHb 作为红细胞细胞生成激发剂的两个研究。然而其他许多类型的 tHb 可能对造血作用提供支持。

最近一个报道总结了在由齐多夫定(AZT)毒性造成的啮齿类动物模型中,hrHb1.1(一种重组 Hb)在活体内恢复造血作用的功效^[77]。结果显示这种 Hb 可以减轻正常和免疫缺陷小鼠体内的 AZT 毒性,将来它可能被应用于临床,用以防治因 AZT 等多种药物或免疫试剂引起的严重的骨髓抑制。相似的是,Lutton 和他的同事报道,给家兔输入 50mL 6%ββ 交联人和牛 Hb(分别是 DECA-Hb 和 XLBV-Hb)有生血作用,输入 50mL 非交联 Hb(HbA)造成耳朵出血^[78]。所有的家兔对 DECA-Hb 或 XLBV-Hb 的耐受性都很好,而输入同等剂量非交联 Hb,50%的动物死亡。输入 Hb 2d 后,对外周血和骨髓的 BFU-E 和 CFU-GM 产量进行分析,发现每一种交联 Hb 不会造成大的变化,而输入 HbA 组可以观察到明显地减少。

Ⅱ期试验已经得到批准,将 O-Raff-Hb(Hemosol)作为红细胞生成的辅助剂在慢性肾衰竭患者身上使用^[79],但至今还没有前期的报道。

5. 局部缺血病灶组织氧合的维持

当发生狭窄、脑卒中、心肌梗死或伴随经皮冠状动脉腔内成形术(PTCA)等治疗介入时,会发生局部临时的血液循环障碍,从而引起供氧不足。在这种情况下,袋装 RBC 对恢复供氧回天无力,因为它们太大不能通过紧缩的血管,或太黏太脆不能通过灌注的气囊式导管,下面对该领域的大量研究总结如下。

5.1 脑缺血

对于患有脑缺血的患者,血液稀释是常用的预防和救治方法,以缓解脑损伤。血液稀释法治疗基于以下两个事实:①血液经多种晶体和胶体溶液稀释后黏度降低;②血黏度和大脑血液流速(CBF)呈反相关。用不载氧的液体稀释则本应有的益处会大打折扣。而用可以载氧的 tHb 则一举两得,即降低了血黏度又能维持原有的供氧能力,与临床常用的静脉溶液供氧相比,tHb 理论上可以改善脑缺血部位的供氧。这种假设已经在几种脑缺血和神经元缺血损伤的模型动物体内进行了试验^[80,81]。

Cole 和他的同事利用经过处理自发形成的高血压大鼠模型,对 DCLHb 在缓解脑缺血方面的治疗作用进行了评估^[82~85]。在这些研究中,中脑动脉闭塞(MCAO)导致 10~90min 缺血,从而引起皮质层和皮质下层持续性缺血。在两个 MCAO 模型中,Cole 观察到用 DCLHb 稀释血液,可以增大 CBF 并且减少梗死体积,作用程度与剂量有关。并且如果血压升高,则能更大程度地减少梗死体积,脑水肿也会得以减轻。因为有数据显示,稀释血液可以增加

CBF,其主要机理是可以使脑部缺血时黏度下降。用 DCLHb 稀释的效果可被拿来与同等剂量相应的膨胀白蛋白(oncologically matched albumin)做比较。数据表明在这些脑部缺血的模型中,DCLHb 在减少脑部缺血造成损伤方面比白蛋白有效得多。并且因为可以使用的血液稀释剂的体积有限,人们发现 20g/dL DCLHb 比 10g/dL DCLHb 的效果更好,这说明 20g/dL DCLHb 类的高度膨胀的血液稀释剂比相对正常膨胀的液体更适用。

有一些证据显示,tHb 作为血液稀释剂和组织氧化剂的效用,取决于 tHb 的结构和性质。比如在暂时脑缺血的沙鼠模型中,用 Hb 聚氧乙烯复合物(PHP)溶液代替部分血液,其临床治疗效果不如 DCLHb^[86]。

DCLHb 类有治疗作用的 Hb 是一种独特的血液稀释剂,因为它除了可以降低血液黏度,还可能通过维持氧供和使 NO 失活来降低脑部缺血造成的伤害。这个假设通过试验得到了证实,在脑部缺血的大鼠身上,将输入 DCLHb 的效果与输入 DCLHb 同时输入 L-NAME(一种 NO 合酶抑制剂)或 L-精氨酸(一种 NO 合酶底物)^[88]做比较,结果发现同时输入 NO 合酶抑制剂并不会降低 DCLHb 在减少梗死大小方面的疗效,但同时输入 NO 合酶底物,则会显著抵消 DCLHb 作为血液稀释剂的疗效。

在脑动脉瘤破裂造成的出血损伤中幸存的患者,其死亡或残疾的主要原因是脑动脉血管痉挛造成梗死,从而引发脑部缺血^[89]。在红细胞的降解产物中,OxyHb 被认为是蛛网膜下出血后脑血管痉挛的主要原因。因此蛛网膜下出血后,输入 tHb 可能不利于脑灌注。在自发形成的鼠的高压模型中,Cole 评估蛛网膜下输入 DCLHb、血液或人工脑脊液对脑血流的影响^[96]。尽管与人工脑脊液相比,蛛网膜下输入 DCLHb 在统计学上增加了血流灌注不足的面积。但该面积只是蛛网膜下输入同等体积血液后灌注不足面积的 20%。尽管可以观察到 DCLHb 轻微的增加了灌注不足的面积,但有意义的是它可以降低梗死大小。

总之,所有的这些临床前研究都支持完成这项随机的、前瞻性的给脑卒中患者使用 DCLHb 的试验^[92]。在Ⅱ期研究中,给急性缺血性发作(定位于前脑循环)的患者在 72h 内,每 6h 输入增量的 DCLHb(25mg/kg、50mg/kg 和 100mg/kg, *n* 分别为 8、8、11)或者安慰剂(生理盐水, *n*=26)。需精心挑选受试患者,他们现在脑卒中症状的出现时间少于 18h,脑计算断层成像扫描必须是正常的,或可以形成梗死,且预期存活时间超过 3 个月。每 15min 测一次血压(MAP)和心率(HR),灌注开始前和开始后 24h 及 77h 分别对 ET-1、儿茶酚胺、肾素、抗利尿激素和心房利钠肽的血浆浓度进行测定。另外,要采集血样进行常规实验室检查,包括肝酶、血液尿素氮、血清肌酸酐、肌酸磷酸激酶和全红细胞计数。安慰剂组 MAP 基线为 112(109~115)mmHg,随时间自动降低,常见于脑卒中患者,这种下降在使用 DCLHb 组的患者中有所缓解,最高剂量组有统计学意义,但是与对照组进行比较,发现没有必要使用抗高血压药治疗,也没有高血压性脑病或梗死出血的



迹象。输入开始后 66h 内，安慰剂组的 HR 比较平稳，但 MAP 显著下降。输入高剂量的 DCLHb 后 HR 在各时间总体降低。安慰剂组的 ET-1 血浆浓度有轻微的改变，24h 和 66h 后，ET-1 的血浆浓度从正常范围的高限降至中点，但 DCLHb 值升高与剂量有关。最高剂量组血浆 ET-1 浓度从基线范围的上限值增至其 4~5 倍（在两个时间段 P 均小于 0.001）。ET-1 血浆浓度的升高和 MAP 的升高是相关的（ $r=0.30$, $P=0.02$ ）。输入 DCLHb 后，其他作用于血管的激素并不受其影响，它们的浓度也与观测到的 ET-1 血浆浓度的升高无关^[93]。与 DCLHb 直接相关的副作用包括皮肤与巩膜的黄色褪去（0/8、1/8 和 11/11）与血色蛋白尿（2/8、6/8 和 11/11）。血色蛋白尿是因为尿液中有排出的 DCLHb，对血清肌酐的测定表明与肾功能的受损无关。在随后的 3 个月观察期内，对照组的 26 名患者中有 3 人死亡，这三人都处于高盐组，27 名 DCLHb 组患者中有 7 人死亡（3/8、1/8 和 3/11）（ $P=0.16$ ）。通过评估 Rankin 残疾分数（Rankin disability score），认为 DCLHb 在神经学上并没有很好的疗效。在临床前研究中，Hb 的活性能够得到较好的证明，疗效较好，DCLHb 组血压没有降低，虽然机体对其有很好的耐受性，但对生存或残疾程度没有好的疗效。总之，在这个患者群体中使用 DCLHb，在神经学上会引发严重的恶性结果，与传统治疗方法相比，会导致更多的患者死亡。

5.2 心缺血

PTCA 术，即经皮穿刺冠状动脉腔内成形术，是临床治疗冠心病的一种重要手段。PTCA 过程中的充分膨胀会使冠状血流局部中断，造成暂时性地局部心脏缺血并增加了室性心律失常的风险。在手术过程中注入载氧溶液的益处已经显现^[94]，而用 Fluosol™（美国，含氟乳剂）相对不太方便而且会产生有争议的后果（该产品已停止上市）^[95]。因为在球囊阻塞时，tHb 可以像全血一样携氧且通过血管成形术导管进行灌注，所以设想在 PTCA 时用 tHb 来增加心肌氧化减少心肌缺血。已在猪体内检验该设想，发现在 PTCA 过程中注入 tHb 可以使球囊闭塞时间延长至 4min 甚至更长，而不降低心脏功能^[96]。尽管这些初步发现令人鼓舞，还没有进一步或者更多的关于 tHb 用于该适应证的临床前或临床试验相关报道。

6. 镰刀型贫血患者释氧能力的提高

镰刀型贫血是由遗传紊乱引起的，特征是慢性溶血和间歇性血管阻塞。这些偶发事件的病理生理学机制的一个因素就是组织缺血和携氧能力受损后造成的栓塞。近期，对患镰刀型贫血成年患者给予单剂量的 0.2g/kg、0.4g/kg 或 0.6g/kg HBOC-201，该项研究的 I/II 期已经完成^[97]。以生理盐溶液为对照。受试者在研究阶段没有出现危象。评价红蛋白安全性的参数包括生命体征、临床实验室测试（全红细胞计数、尿分析、凝集特征、血清电解质、肝和肾功能检查）、经皮量氧法和不良反应记录。另外，对每个受

试者还要进行一些挑选的肌功能评估，包括握力测试和有氧代谢能力评估。有氧代谢能力评估需要分别在基线期（治疗开始前 16h）以及灌注 HBOC-201 后 4h 和 48h 进行。

患者对 HBOC-201 灌注有很好的耐受性，未显示有毒性。循环中的 Hb 水平、血压、血液动力学或临床实验室参数均未发生明显变化。尿液中未检测到 Hb，也没有监测到肝脏和肾毒性。测试期间治疗组的握力测试没有表现出差异。尽管在所有组里的有氧训练强度是一样的，但是服用 HBOC-201 的患者的 HR 反应明显不同于不同训练程度的对照组患者。在 4h 时，HBOC-201 组受试者的 HR 明显低于他们在基础训练期的 HR。在盐溶液组和 48h 时，观测不到这些差异。同样，4h 时，HBOC-201 组的受试者如酸水平略高于基础期，这些差异不具有统计意义。在 48h 或安慰剂组观测到的结果同样没有统计意义。

该项研究支持了另一个同时进行的实验结果，即对健康志愿者所做的实验，试验得出结论说 HBOC-201 可以像自体血那样供应机体达到最大运动量，同时还能保持较低的脉搏率、CI（心脏指数）、乳酸盐浓度等^[98]。这两项研究均指出供应非细胞 Hb 可能是向组织输氧的有效途径。

7. 挤压受伤后的复原

小体积的治疗用血红蛋白溶液也可用于两种致死性压力相关的外伤：第一种是撞伤或者气压性挫伤类似的爆炸超压（爆炸引起的突然快速的大气压力的升高）或非穿透性损伤引起的对肺和胃肠道的伤害；第二种伤害是头部严重外伤和相关的低血压。例如，在非穿刺性地外伤引起的多种损伤中几乎 20% 包含肺部挤压（外伤严重分数大于 15）（耶鲁外伤记录），而且与肺炎、呼吸衰竭、成人呼吸困难综合征、死亡的发生率的显著增高有关。在生还者当中，慢性的呼吸困难的概率增加。与之类似的是，在美国头部受伤是被撞死亡的主要原因，同时出现低血压的时候，不良后果（严重机体无能、植物人或死亡）出现概率显著增加。这些类型的受伤由于二次伤害（位置常常离初次伤害很远）的存在而复杂。积极的恢复组织的氧合能防止二次受伤，改善预后。然而，由于这些伤害常常伴随着肿胀，积极地补充大量电解液可能是个相反的治疗方向。与之相反，小体积的治疗性地携氧血色素溶液或许能够在受伤及其周围区域恢复组织的灌注，保持氧合，减少水的积留。

Cohn 和他的同事用猪做模型检测了在肺部创伤后，血管活性红细胞替代物对呼吸紊乱的作用^[100]。对幼 Yorkshire 猪（每组 6 只）麻醉和机械呼吸，每只猪都在其右胸腔基线水平施以空气爆炸，并在 20~40min 的时间内用 0.9% 的盐水（90mL/kg）或者双阿司匹林交联的血红蛋白（DCLHb；15mL/kg）复原。之前 20min 以 30mL/kg 的量抽血。从最初的伤害到 4h 的观察期结束，对实验的猪一直灌输保养液体（盐水组合 4mL/kg 的 DCLHb 组）。连续的肺部和系统血液动力检测仪器一直在检测实验对象的肺部和血液动力状态及总的胸部评测，螺旋三维计算机断层扫描，用肺部质量（3 个/组）来评价受伤创面和肺积水。在

两个实验组中, MAP 都有所回复, 但是用 Hb 治疗的实验组中显著升高。两个组的氧合情况均恶化, 依从性也都出现了降低。但试验结束时, DCLHb 组依从性下降更明显, 作者发现使用 DCLHb 使得挫伤创面尺寸变大。因此这种治疗用血红蛋白对气压性挫伤模型无效。

另外, Shackford 在低温脑损伤并休克的猪模型中, 使用少量复苏溶液 (4mL/kg), 分别为 RL、高渗 HSD 和 DCLHb。结果发现 HSD 和 DCLHb 对这一模型有利^[101]。在这些试验中, 猪受到了低温损伤, 并出现 Wiggers 型出血, 输入少量 asanguinous 溶液复苏。第一个治疗方案是持续注射 RL 后, 再输入 RL, 从而使 MAP 回复到基线水平 (RL/RL); 第二个方案是在持续注入 RL 后, 再输入 7.5% 高渗盐的 6% 葡聚糖溶液从而使 MAP 回复到基线水平 (HSD/RL); 第三个治疗方案是在持续注射高渗乳酸钠后, 输入 HSD, 使 MAP 回复到基线水平 (HSD/HSL)。在三个治疗方案中, 复苏开始后 1h, 流出血 (shed blood) 得以恢复。在另一个试验中, 受试组输入 DCLHb, 流出血没有恢复。总之在颅内依从性降低时, 小体积的高渗溶液或血红蛋白溶液作为复苏溶液, 有利于脑灌注压。

对脑损伤的临床处理包括使用渗透性或其他利尿剂来控制组织水肿, 并使用药物来改变血液流变学性质, 从而灌注脑并治疗缺血。近年来有两个报告总结了啮齿类动物在脑外伤后, 用 DCLHb 或等渗血浆蛋白溶液稀释血液的效果。脑部受严重外伤后 4h, Piper 等^[102]监测感觉运动皮质的心室内颅内压 (ICP) 和 CBF, 发现 DCLHb 能够显著降低 ICP 值, 平均值从 $(13 \pm 2) \text{ mmHg}$ 降为 $(3 \pm 1) \text{ mmHg}$ ($P < 0.001$), 并且使 CBF 从 $(21 \pm 2) \text{ mL}/(100 \text{ g} \cdot \text{min})$ 增至 $(29 \pm 2) \text{ mL}/(100 \text{ g} \cdot \text{min})$ ($P = 0.032$)。在创伤后脑隆起的啮齿类动物模型中, DCLHb 可以改善冠状灌注压而不引起 CBF 的降低。同样, Nary 等将脑外伤后麻醉的大鼠用 DCLHb 或用与肿胀的人血清白蛋白进行相匹配的血液稀释, 对海马体抽样检查, 观察有无坏死的神经元^[103]。用白蛋白进行治疗易于减少海马体内坏死的神经元数, 而 DCLHb 则能显著降低该位置坏死的神经元, 这说明脑外伤后, 使用 tHb 进行血液稀释, 可以缓解海马体内神经元缺血。

这些临床试验结果表明也许可以深入进行治疗性血红蛋白用于严重脑外伤的研究。

安全性

注入非细胞 tHb 后, 血浆中的 Hb 浓度从 $1 \sim 3 \text{ mg/dL}$ (正常值) 到高至每升几克。这样高的浓度 ($\geq 15 \text{ mg/kg}$) 已足以抵抗触珠蛋白的清除作用^[14]。另外, 一些 tHb 不与触珠蛋白结合, 从而不会被清除。

血红蛋白以 oxyHb 形式循环的时间不定, 而血红素上配体的铁则自动或受化学诱导充当氧化剂产生 metHb^[104,105]。Hb 被氧化的概率取决于多方面的因素, 包括 Hb 的形状、氧化剂的浓度、患者的病理生理状况

等^[106]。红细胞中的高铁血红蛋白还原酶维持 metHb 在一个相对恒定的水平, 而非细胞 Hb 则不断地被氧化 metHb^[14]。因此血浆中循环的 metHb 含量可能会达到很高甚至每升几克。

细胞内有酶系统将 metHb 还原为 Hb^[14], 而血浆中的 met-还原成分浓度则很低。唯一能还原非细胞 metHb 的还原成分则明显是由红细胞输出的; 已有几个实验室发现该成分能在体外还原 metHb^[62,63], 但却很难在体内定量。

由于血浆中有存在高浓度 metHb 的可能, 人们开始关注血晶素和铁的不恰当释放。通常血浆中的血晶素含量几乎可以忽略不计, metHb 的血红素-蛋白相互作用被减弱, 因为血晶素可能被转运到亲脂表面如红细胞膜或内皮细胞膜。有报道称血晶素附着在这些位点后能促进细胞裂解^[108], 可以是直接作用, 也可能与过氧化氢协同作用。类似地, 科学家和医生们早就认识到游离的或包埋在酶内的铁离子催化体内和体外氧化反应的能力。因此, 关于使用大量具有氧化还原活性的 Hb 的安全性问题将会继续处于激烈的争论中^[109~112]。

综合图 2 列出的种种可能, 如果具有氧化还原活性的非细胞 tHb 能加重损伤, 那么在体内与大量 Hb 接触的细胞和组织也应该可以观察到直接和间接的类似结果。例如, 如果接触 Hb 会产生活性氧簇 (如超氧自由基负离子、过氧化氢或过氧化亚硝酸盐), 那么应该可以观察到白细胞黏附增加、外周血单核细胞活化以及细胞壁整体性的改变。同样也可能出现与 Hb 有关的损伤的非直接效应。例如超载蛋白质细胞对局部缺血损伤的敏感度增加 (例如, 已知在肾的管状上皮细胞摄入天然的 Hb), 对 Hb 结合或沉积 (例如, 灌注天然 Hb 后, 在肾管状上皮细胞的铸型中经常观察到) 导致的细胞膜表面阻塞的敏感度增加。

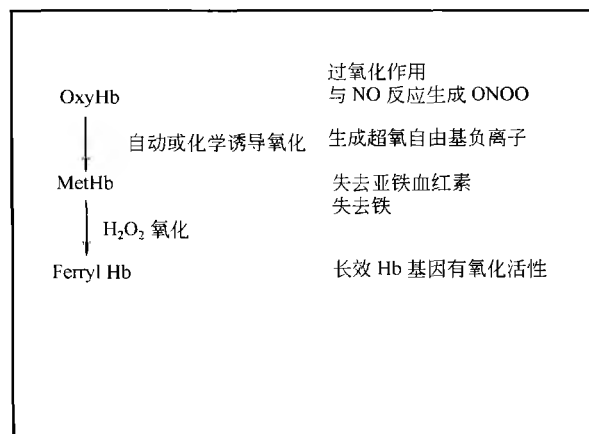


图 2 Hb 修饰伤口的潜在机制

许多文献中多次提到血红蛋白制剂的安全性。一些历史中的血红蛋白制剂安全问题在先进的临床试验中得到解答, 不再成为问题。例如, 在血红蛋白制剂中, 没有中性粒细胞和巨噬细胞活化效应, 不会形成小血栓, 不发生血小板凝集。但是临床观察的效果引起了新的安全忧虑。接

下来将讨论人们关注的三个主要方面：①Hb 的升高血压能力；②非细胞 Hb 恶化病情的可能性；③Hb 加强或阻碍感染的潜力。

1. Hb 升高血压的活性

基本上所有的 tHb 注入哺乳动物体内后，观察到平均动脉压、肺动脉压、全身和肺血管阻力均有上升。增加的幅度根据试验对象和试验方法有所不同。多数情况下平均动脉压上升最多，却明显受自身因素的制约（即上升是非连续的，与剂量无相关性），而其持续时间明显和 tHb 的结构、剂量等性质有关。

越来越多的证据表明 Hb 升高血压涉及多种机理的相互作用。Hb 的膨胀和黏度引起血压升高的一些机理看来并不是很重要。例如，注入等渗入血清白蛋白或相应相对分子质量的右旋糖苷和羟乙基淀粉溶液后均未发现明显的血压改变。类似地，由 tHb 溶液引起的血管收缩作用超过了由于稀释血液降低黏度所引起的血管舒张作用^[113]。

协同作用于血管的 NO 和内皮素-1 (ET-1) 被认为可以介导许多生理反应，包括血压平衡自我调节、血管结石、血液向组织流动、酶或体液在肾脏和胰腺等组织的分泌^[114~116]。tHb 对血压和血液动力的作用和这两种介导体都有关系，因此提出了两个关键性问题：①tHb 引起的血压升高是否可以看成是失血、器官灌注液减少、关键器官微循环局部缺血等症状复苏的迹象。机体处于失血或低血容状态时，组织灌注和氧化可能已经减弱，血管收缩强度的加大可能恶化病情。②升高血压的这些机制是否会改变机体其他重要系统的功能，尤其是分泌系统各个器官（如肾脏或胰腺）。这两个问题目前仍然备受临床和管理机构的关注。

为解决问题①，已用系列方法做了许多临床前试验，研究用 Hb 治疗血容量过多或失血休克复苏，如用血液动力学测量方法、酸碱状态、放射微球法、超声流量探测器测血流、活体显微镜检查等手段来测量 tHb 对微循环灌注的作用^[39]。已通过钽卟啉磷光技术、组织传感器、氧电极、耗氧量等方法测试了重要组织的氧合情况。缺血休克模式动物系列研究表明 tHb 能恢复 MAP、碱不足，并使皮下和黏膜 pO_2 恢复至基线水平^[118~120]。还有研究表明对易受缺血损伤的器官，如肠和胰腺，输入 tHb 比输血对恢复微循环更有益^[121,122]。相似地，将 tHb 应用于败血病动物的研究中，发现它能恢复 MAP、体循环血管阻力、重要器官的血流等^[123]。总而言之，虽然血流重新分布的作用因 Hb 而异，试验结果显示，tHb 的加压作用能改善微循环和重要器官的血流^[124,125]。

关于问题②，近来有大量报道称 tHb 清除 NO 或增加 ET-1 均对系统有局部和全身影响。因此，tHb 对 NO 的清除已被提出作为注入基因工程的 tHb、分子内交联 Hb^[126,127] 和 α -Raff-Hb^[56] 后时常发生的胃肠道症状的起因。类似地，有人提出 tHb 注入后血清中淀粉酶和脂酶的增加和 NO 介导的活性受到抑制及血浆 ET-1 增加有关^[128]。举

例说明，已知 ET-1 会减少胰腺的灌注量^[129]，那么 tHb 促进其含量增加，则对微循环氧合产生不利影响。

虽然目前生产的 tHb 肾安全性问题似乎令人满意，Hb 修饰大大减少了但是还没有消除肾脏的吸收和滤过。因此假设，肾脏管状细胞中高浓度的 tHb 会影响该器官对其他蛋白的处理。有趣的是，Gburek 和他的同事最近在肾脏末梢小管细胞中发现了能普遍识别小鼠、人和猪血红蛋白的 Hb 结合位点^[130]。如果在人 Hb 处理器官中发现类似的位点，那么就有理由认为结合 Hb 后胞饮作用的减慢会干扰其他蛋白质或肽链的结合，而这种干扰可能会大大增加血浆中这些蛋白或肽链的浓度。

临床试验中注入 tHb 用于失血休克的患者复苏或作为血液的替代品，其预数据显示了不一样的结果。现有的数据太少，不能说明其血管加压活性是 tHb 治疗作用的因素之一。

败血症性休克患者机体产生的过量 NO 已成为内毒素症干扰治疗的主要靶标^[131,132]。一氧化氮合成酶 (NOS) 抑制因子如精氨酸衍生物 (L-NMMA、L-NAME 和 NNLA) 或亚甲基蓝能提高血压增强血管功能，因此有人提出将这类试剂用于败血症性休克症。然而初步的临床试验发现，这类非选择性抑制因子也许并不能提高存活率，尽管它们能提高 MAP、血管阻力和恢复血管对去甲肾上腺素的反应^[133]。Hb 的 NO 清除活性促进了将它应用于败血症性休克症治疗临床前和临床实验，如最近一个实验，在啮齿类内毒素血症动物身上比较了 Hb、HBOC-201 与这些 NOS 抑制剂的作用^[67]。结果显示用 HBOC-201 治疗可以增强小鼠肾脏和心血管的功能，而非选择性 NOS 抑制剂治疗则无此作用。

有关该适应证的临床试验数据则比较少。一个观察试验显示 DCLHb 对 14 名败血症休克或全身炎症反应综合征的重病患者有益处^[71]。类似用 PHP-Hb 治疗血容不对症血管加压药依赖性休克患者，发现患者稳定性提高，同时机体对血管加压药的需求减少了^[70]。

2. 非细胞 Hb 恶化病情的可能性

总体而言，曾经报道过体外试验不良反应并没有在临床前期试验和临床试验中出现。大规模临床前动物研究显示，Hb 没有快速降解（氧化为 metHb 或意外丢失亚铁血红素），非转铁蛋白结合的铁浓度未发生变化，将受试动物容量负荷部分或全部的血用 tHb 代替后，没有出现血晶素毒性或溶血现象等^[134]。类似的活体显微观察研究发现了 tHb 恢复缺血性休克患者微循环的功能，而这是晶体和胶体溶液所没有的^[135]。并且采用 tHb 溶液复苏利于使功能毛细血管密度恢复到失血前状态，且未出现内皮受损的迹象，如白细胞黏附增加、内皮对染料标记的大分子的渗透性增加。尽管一些组接触 Hb 后组织中出现了丙二酰硫脲活性物质浓度增加或共轭二烯释放增多的现象，但没有出现组织病理学改变（水肿、坏死、细胞浸润和出血）或者器官功能显著降低^[136]，并且生理学酸碱平衡和肠黏膜 pH i 的



恢复等有效复苏的标记,都说明微循环功能已经恢复。

在至今为止的各种试验中,已有数百位患者接受了低到中等剂量的 tHb 溶液,还有极少数患者接受了大剂量(100~500g)的 tHb。多数情况下,灌注是耐受的。然而,还有几个相对一致的发现,将在下面讨论。

2.1 假黄疸

从系统循环清除出的 tHb 将在几个器官和组织中(包括肾脏、肝脏和脾脏)分解成胆红素。对动物使用 tHb 后,尸体剖检经常观察到动物肝脏质量增加,在显微镜下可见染色的 Kupffer 细胞。肝脏可被普鲁士蓝染色,说明在肝脏和 Kupffer 细胞中有含离子的色素,而 ALT 没有上升说明变化和肝中毒无关。在恢复过程中色素沉着变淡。所有这些观察结果都说明了非细胞 tHb 在这个器官的分解代谢。和该分解代谢一致,动物临床前试验灌注 tHb 后白蛋白胆红素浓度增加,而在恢复期则逐渐恢复到正常水平。

临床上也发现了该类假黄疸现象。在一个对重病患者的研究中,灌注 tHb 后观察到患者的肤色变黄。这或者是新出现的,或者是原有颜色得到加深^[71]。该项研究中记录了 14 名患者中 6 人的反应。3 名出现该症状的患者曾经接受过总量为 20g 的 DCLHb (200mL),3 名接受过 50g (500mL)。这种现象是暂时的,输入后 24h 颜色最深,5d 后恢复到输入前水平,在这点是-致的。假黄疸现象与肝功能测试中其他变化无关,与胆红素的升高存在某种联系。在使用 DCLHb 的心脏手术中,104 名患者中的 39 人也出现了相似的、暂时的假黄疸^[54]。这些患者一般都接受了 25~75g (250~750mL) 的 DCLHb,没有出现肝功能受损的迹象。对数据进行总结,认为这可能是血浆 Hb 细胞内代谢的结果。

相似地,将 PolySFH-P 输入体内后的前 3d,胆红素的总浓度增加到 $(2.4 \pm 1.7) \text{g/dL}$,然后逐渐恢复^[53]。尽管报道中没有将其作为有害事件,但是胆红素的浓度已高到引起争议。如在健康的婴儿体内,如此高浓度的胆红素可能会导致神经毒性^[137]。然而已有假设认为胆红素在有些情况下可能是天然的抗氧化剂^[138],也许事实的确如此。

尽管没有最初的 Hb-PHP 或 HBOC-201 临床试验预数据,但是有理由推断这些 tHb 被清除出循环后进行了降解,血浆中的胆红素总量将会增加继而下降。

2.2 灌注血红蛋白后酶和内分泌肽含量增加

在临床预试验中,发现灌注单剂量或重复剂量的 tHb 后,几种血清酶和内分泌肽含量可逆性提高。如单次 DCLHb (100~4000mg/kg) 灌注大鼠、狗和猴子后,AST 和山梨醇脱氢酶(SDH)浓度发生了轻微到中等程度的浓度提高^[139]。这些变化与组织病理学改变无关,恢复期酶的含量又回到基线值。因为灌注白蛋白溶液后可观察到相似的 AST 升高现象,人们假设这种升高可能与使用的蛋白质质量和体积有关。

相似地,多次灌注猴子 1000~2000mg/kg DCLHb 7d

后或每 6h 400mg/kg 灌注 3d 后,猴子体内 AST (天冬氨酸转氨酶)、LDH (乳酸脱氢酶)、CK (肌酸激酶) 均有上升^[139]。CK 和 LDH 同工酶的分布情况表明主要是 CK 的 MM 亚型和 LDH 的 LD-5 亚型增多。MM-CK 主要产生于骨骼肌,也可以产生于心肌,但只由心肌产生的同工酶 MB 的含量却没有升高。LD-5 含量的升高也与其产生于骨骼肌有关。

类似地用 0.6g/kg 的 α -Raff-Hb 灌注狗后,AST、ALT、 γ -谷氨酰基转移酶和 LDH 浓度均发生了瞬时提高^[56]。该变化涉及这种非细胞 Hb 在肝脏中的分解代谢。

大鼠和小狗失血导致血浆中 ET-1 的增加可能是天然的代偿反应的一部分^[140,141]。应激激素或级联凝结的作用^[136]或者是 ET-1 代谢场所肝脏、肾脏和肺部清除作用减弱改变了血液动力^[117],从而促进了 ET-1 的合成或释放^[142],使其浓度增加。最近的体内研究已经证实了使用 DCLHb 后内分泌肽 ET-1 在心血管收缩中起重要作用^[143]。现在已经将血浆中 ET-1 浓度的升高和大鼠、猪的 DCLHb 收缩活性及猪肺部容量相联系起来^[144~147]。然而其预见性的价值却很难最大化,因为不同组织、不同器官和不同种属的 ET 受体变化非常大^[142]。而且 Hb 的结构或性质与 ET-1 浓度增加的关系尚且未知。

有多种 tHb 临床试验观察到这些血清酶的瞬时增多。例如使用 0.6g/kg 体重剂量的 α -Raff-Hb,可以观察到胆红素总量、AST、ALT、 γ -谷氨酰基转移酶和 LDH 的变化^[148]。这些改变是由 Hb 在肝脏代谢引起的,无临床意义。另外,接受这个剂量药物的患者在 24h 时间点可以观察到血清淀粉酶和脂肪酶暂时上升,胰腺功能标记物增多。后一个变化的强度和时间进程不同于急性胰腺炎模式,并且没有临床意义。

手术和重病患者使用 DCLHb 的临床试验中,也能检测到血清 AST 浓度暂时升高^[54]。单剂量或累计剂量 20g 或更多的 DCLHb,在临床试验中引起血清淀粉酶增多,可升高到血清淀粉酶正常含量上限的 2~3 倍。这些患者中也可观察到预期中的急性胰腺炎,但极为罕见^[148]。

最后,在急性外伤和紧急手术患者中使用 PolySFH-P,可观察到血清 AST 和淀粉酶含量暂时升高^[53]。灌注该 tHb 24h 时,AST 浓度翻番,此后降低至灌注前水平。相似地是,灌注 PolySFH-P3d 后,浓度也为灌注前 2 倍。这些变化都被认为无临床意义。

DCLHb 临床试验已经揭示 ET-1 在至少一种 tHb 诱导的血液动力改变中发挥作用^[92]。通常情况下人血浆外周循环中 ET-1 水平 $(1.6 \sim 4.9 \text{pg/mL})$ 要远低于病理情况下的水平^[142],而反复灌注 100mg/kg DCLHb 后,血浆中 ET-1 水平达到急性心肌梗死、心源性休克或心力衰竭后的 4~5 倍或更高^[149~151]。虽然 ET-1 浓度提高的这种水平可能是由某种特定的 DCLHb 引起的,尽管量很少,临床上仍在关注其他 tHb 诱导 ET-1 释放的可能。在体内,即使这种肽水平很低也能加强其他激素或内分泌物质如 NO 的收缩作用^[152]。

3. 血红蛋白加强或恶化感染的可能

非细胞 Hb 最大的潜在用途是紧急救护外伤失血性休克，而这类患者的细菌感染概率很高。因此人们广泛讨论血红蛋白加强或恶化感染的可能性。

1890 年首次描述了细菌和血液成分协同致死作用。起初认为血液中的 Hb 是致死因素^[153]，但随后的研究指出血晶素和铁离子可能是促进死亡的成分^[154,155]，而非细胞的 (met) Hb 可能是这两种成分的潜在来源。

现已经有假设认为非细胞 Hb 分子会伤害小肠上皮细胞^[156]。在正常情况下，该组织是高度选择性的屏障，能够吸收营养物质并限制微生物和潜在毒性大分子从肠腔进入血液循环。扰乱肠道的屏障功能可能增加败血病患者或烧伤患者^[157]、多处外伤患者^[158]、正在实施心肺旁路或大手术患者^[159]和多器官功能障碍患者^[160]小肠的透过性。另外，GI 黏膜酸毒症作为多器官功能障碍和危重患者死亡的信号^[161,162]，与黏膜渗透性增加密切相关^[163]。失血未复苏时，还可发现小肠的屏蔽作用已不具有抵抗力。但是经常性地使用 tHb 能恢复小肠的 pH i^[165~168]。而且，组织病理学检测表明使用具有代表性的 tHb-DCLHb 后，细胞壁的完整性没有改变^[169]。另外组织培养支持细菌转移被削弱的理论。

tHb 是否会强化内毒素致死作用的问题还没有解决。活体 *E. coli* 或内毒素诱导小鼠败血病后，一些 Hb 制剂显示有恶化作用^[170~172]。与之相反，用性质较好的修饰 Hb 溶液对小鼠和其他的模式动物进行的试验均不支持上述结论^[172,173]。

例如，人们假设 DCLHb 可以改善血压、器官灌注情况和死亡率，并将此假设在败血病啮齿类动物模型上验证^[169]。给垂死的患败血症的大鼠灌注这种 tHb，与输入白蛋白相比，可以马上恢复降低的 MAP，增加体循环血管阻力 (SVR)，并且 24h 时能显著改善重要器官的灌注情况 (肠、心脏和脑)。另外，在没有表现出灌注升高的区域，也没有出现灌注不足的现象，说明这些区域得到了充分的灌注。

给患败血症的绵羊输入大剂量的 50mg/kg、100mg/kg 或 200mg/kg 的 Hb-PHP，可以观察到类似现象^[175]。三个剂量的 Hb 都能够增加 MAP 和 SVR，并且降低 CI，从而可逆性地改善败血症的高动力循环。尽管注入 Hb 后，肺动脉压升高，但它并不会对动脉血氧饱和度有不利的影响，也不会引起肺水肿，且肺部组织中共轭二烯的量没有显著升高，这说明输入低剂量的 tHb 并不会引起自由基的增加。注入 100mg/kg 剂量后，虽然血清铁浓度显著增加，但不会超过铁结合力，表明没有自由铁促进细菌生长。Hb 组和对照组的肺细菌清除率、白细胞计数及分化没有差异 (肺部为绵羊主要的 RES 器官)，表明在该模型中 Hb 与网状内皮系统活性无关，用 Hb 治疗动物后没有出现死亡。

尽管临床试验刚起步，但是临床试验数据与上述临床前发现类似。曾将 DCLHb 应用于重病患者，患者患败血

性休克或全身炎症反应综合征 (SIRS)。在第一项研究中，输入 tHb 后，血清铁浓度升高，但没有明显的毒性，败血病没有恶化^[71]。相反，在第二项研究中，DCLHb 用于 23 个病情危急、主要为败血病的急性贫血患者。注射 24h 后，携氧、氧耗及所有器官的功能以及代谢状态得到了维持甚至改善^[176]。

tHb 被应用于一定的患者群，其中大部分是年老者 and 贫血病患者或是患有多种病症的患者。没有报道称使用 tHb 后患者更容易被感染或者已有的感染被恶化。综合临床试验初期数据指出 tHb 对于败血病患者或者易感人群的有利作用很大。

临床试验情况

尽管该生物新药开发的阻碍很多且花销巨大，仍然至少有 5 家公司还在进行血红蛋白氧载体的临床试验 (表 2)。大多数公司是在开发天然来源 (牛或胎牛红细胞) 的修饰血红蛋白，但是至少有一家采用的是生物技术途径。正在研究的每种血红蛋白都是独特的，它们都具有血红蛋白的基本特性 (即运输氧的功能和本身颜色)，同时还具有适应各自特定治疗目的的独特性质 (即组成、配方等)。

在写本章综述时，世界各地的临床试验也正在完成中。许多 I 期和 II 期试验是有关安全性的和剂量爬坡研究，一些 III 期研究则是明确的功能性研究，有望进行注册申请。在众多试验中，数百位患者在临床试验中接受了低剂量血红蛋白溶液治疗，更有少量的患者接受了大剂量 (100~300g) 的治疗血红蛋白 (等同于 6 个单位 10g/dL 血红蛋白溶液)。两种 tHb-DCLHb 和 rHb1.1 的开发在临床试验失败后已停止。目前还没有一种治疗性血红蛋白得到批准用于临床。

结论

开发治疗性血红蛋白的进程如此缓慢是出乎意料的，因为我们对于血红蛋白是非常熟悉和了解的。进展受到了两大因素的影响：一是临床对于总体及局部循环的体内稳态和不供氧维持作用的理解在迅速地扩展和变更；二是对非细胞 tHb 灌注后机体生物学和生理学上的理解不完全，这使得前一种理解变得更加扑朔迷离。每一个临床试验在报道其治疗价值时都需权衡它的好处与坏处，并仔细对比它的最适病症。然而，临床试验的目标是不变的。正如 Sloan 和他的同事所说，临床应用的目标“反映了研究人员提高那些常规治疗无望的患者存活率的强烈愿望”^[94]。

参考文献

1. Blundell, J. Experiments on the Transfusion of Blood by the Syringe. *Medicochir. Trans.* 1818, 9, 56-92.
2. Surgenor, D. M.; Wallace, E. L.; Hao, E. S.; Chapman, R. H. Collection and Transfusion of Blood in the United

X

- States, 1982—1988; *New Engl. J. Med.* 1990, 322, 1646—1651.
3. Wallace, E. L.; Churchill, W. H.; Surgenor, D. M.; An, J.; Cho, G.; McGurk, S.; Murphy, L. Collection and Transfusion of Blood and Blood Components in the United States, 1992. *Transfusion* 1995, 35, 802—812.
4. Hébert, P. C.; Schweitzer, I.; Calder, L.; Blajchman, M.; Giulivi, A. Review of the Clinical Practice Literature on Allogeneic Red Blood Cell Transfusion. *Can. Med. Assoc. J.* 1997, 156 (Suppl 11), S9—S26.
5. Schreiber, G. B.; Busch, M. P.; Kleinman, S. H.; Korelitz, J. J.; The Risk of Transfusion-Transmitted Viral Infections. *New Engl. J. Med.* 1996, 334 (26), 1685—1690.
6. Peek, C. C.; Moore, G. L.; Bolin, R. B. Adenine in Blood Preservation. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1981, 13, 173—212.
7. Simchon, S.; Jan, K. M.; Chien, S. Influence of Reduced Red Cell Deformability on Regional Flow. *Am. J. Physiol.* 1987, 253, H895—H903.
8. Doyle, M. P.; Walker, B. R. Stiffened Erythrocytes Augment the Pulmonary Hyperdynamic Response to Hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 1990, 69, 1270—1275.
9. Fakhry, S. M.; Sheldon, G. F. Blood Administration, Risks, and Substitutes. *Adv. Surg.* 1995, 28, 71—92.
10. Tartter, P. I. The Association of Perioperative Blood Transfusion with Colorectal Cancer Recurrence. *Annals of Surgery* 1992, 216, 633—638.
11. Tartter, P. I.; Burrows, L.; Kirschner, P.; Perioperative Blood Transfusion Adversely Affects Prognosis After Resection of Stage I (subset NO) Non-oat Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1984, 88, 659—662.
12. Heiss, M. M.; Mempel, W.; Jauch, K. W.; Delanoff, C.; Mayer, G.; Mempel, M.; Eissner, H. J.; Schildberg, F. W. Beneficial Effect of Autologous Blood Transfusion on Infectious Complications after Colorectal Cancer Surgery. *Lancet* 1993, 342, 1328—1333.
13. Davidsohn, I. Reflections on the Past, Present, and Future of Blood Transfusion. *Practical Blood Transfusion*; Huestis, D. W., Bove, J. R., Busch, S., Eds.; Little, Brown and Company: Boston, 1969.
14. Bunn, H. F.; Forget, B. G. Hemoglobin; Molecular, Genetic and Clinical Aspects; W. B. Saunders Co.; Philadelphia, 1986.
15. Winslow, R. M. Hemoglobin-based Red Cell Substitutes; Johns Hopkins University Press; Baltimore and London, 1992.
16. DeVenuto, F. Appraisal of Hemoglobin Solution As a Blood Substitute. *Surg. Gynec. Obstet.* 1979, 149, 417—436.
17. Willinger, C. C.; Schramek, H.; Pfaller, K.; Joannidis, M.; Deetjen, P.; Pfaller, W. Ultrapure Polymerized Bovine Hemoglobin Improves Structural and Functional Integrity of the Isolated Perfused Rat Kidney. *Renal Physiol. Biochem.* 1995, 18, 288—305.
18. Nosé, Y. Oxygen-Carrying Macromolecules; Therapeutic Agents for the Treatment of Hypoxia. *Art. Organs* 1998, 22 (7), 618—622.
19. Linberg, R.; Conover, C. D.; Shum, K. L.; Shorr, R. G. Hemoglobin Based Oxygen Carriers; How Much Methemoglobin is Too Much? *Art. Cells Blood Subs. Immob. Biotech.* 1998, 26, 133—148.
20. Rabiner, S. F.; Helbert, J. R.; Lopas, H.; Friedman, L. H. Evaluation of a Stroma-free Hemoglobin Solution for Use As a Plasma Expander. *J. Exp. Med.* 1967, 126 (6), 1127—1142.
21. Kaca, W. Hemoglobin, a Newly Recognized Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein That Enhances LPS Biological Activity. *J. Biol. Chem.* 1994, 269 (40), 25078—25084.
22. Bunn, H. F. Hemoglobin Function in Stored Blood. *J. Clin. Invest.* 1969, 48, 311—321.
23. Sanders, K. E.; Ackers, G.; Sligar, S. Engineering and Design of Blood Substitutes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996, 6, 534—540.
24. Looker, D.; Abbott-Brown, D.; Cozart, P.; Durfee, S.; Hoffman, S.; Mathews, A.; Miller-Roehrich, J.; Shoemaker, S.; Trimble, S.; Fermi, G. A Human Recombinant Haemoglobin Designed for Use as a Blood Substitute. *Nature* 1992, 356, 258—260, Although development of this Hb has been halted, the commercial development of other recombinant Hbs continues at Baxter Healthcare Corp.
25. Ogden, J. E.; Coghlan, D.; Jones, G.; Denton, K. A.; Harris, R.; Chan, B.; Woodrow, J.; Wilson, M. T.; Expression and Assembly of Functional Human Hemoglobin In *S. Cerevisiae*. *Art. Cells Blood Subs. Immob. Biotech.* 1992, 20 (2—4), 473—475.
26. Kumar, R.; Manjula, B. N. Human Hemoglobin Derived from Transgenic Swine: A Starting Material for “Blood Substitute” Formulations. *Red Blood Cell Substitutes*, Rudolph, A. S., Rabinovici, R., Feuerstein, G. Z., Eds.; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1998; 309—324.
27. Conover, C. D.; Lejeune, L.; Shum, K.; Gilbert, C.; Shorr, R. G. L. Physiological Effect of Polyethylene Glycol Conjugation on Stroma-free Bovine Hemoglobin in the Conscious Dog After Partial Exchange Transfu-



- sion. *Artif. Organs* 1997, 21 (5), 369–378.
28. Lips, V.; Celedón, G.; Escobar, J.; Lissi, E. A. Thiol-induced Hemoglobin Oxidation. *Redox Report* 1996, 2 (3), 205–212.
29. Rudolph, A. S. Encapsulation of Hemoglobin in Liposomes. *Blood Substitutes: Physiological Basis of Efficacy*, Winslow, R. M., Vandegriff, K. D., Intaglietta, M., Eds.; Birkhäuser: Boston 1995; 90–104.
30. Torchilin, V. P. Modification of Molecules and Particles With Polyethylene Glycol (PEG): Long-Circulating Pharmaceuticals. *Advances in Blood Substitutes: Industrial Opportunities and Medical Challenges*, Winslow, R. M., Vandegriff, K. D., Intaglietta, M., Eds.; Birkhäuser: Boston, 1997; 251–297.
31. Brandl, M.; Gregoriadis, G. Entrapment of Haemoglobin into Liposomes by the Dehydration-rehydration Method; Vesicle Characterization and In Vivo Behavior. *Biochim. Biophys. Acta* 1994, 1196, 65–75.
32. Phillips, W. T.; Klipper, R. W.; Awasthi, V. D.; Rudolph, A. S.; Cliff, R.; Kwasiborski, V.; Goins, B. A. Polyethylene Glycol-Modified Liposome Encapsulated Hemoglobin: A Long Circulating Red Cell Substitute. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999, 288, 665–670.
33. Nakai, K.; Usuba, A.; Ohta, T.; Kuwabara, M.; Nakazato, Y.; Motoki, R.; Takahashi, T. A. Coronary Vascular Bed Perfusion with a Polyethylene Glycol-Modified Hemoglobin-Encapsulated Liposome, Neo Red Cell, in Rats. *Artif. Organs* 1998, 22 (4), 320–325.
34. Tsuchida, E.; Takeoka, S. Stabilized Hemoglobin Vesicles. *Artificial Red Cells: Materials, Performances and Clinical Study as Blood Substitutes* Tsuchida, E., Ed.; John Wiley & Sons: New York, 1997; 35–64.
35. Usuba, A.; Motoki, R. Safety and Efficacy of Encapsulated Hemoglobin in Hemorrhagic Shock. *Artificial Red Cells: Materials, Performances and Clinical Study as Blood Substitutes*; Tsuchida, E., Ed.; John Wiley & Sons: New York, 1997; 65–92.
36. Sakai, H.; Tsai, A. G.; Intaglietta, M.; Tsuchida, E. Hemoglobin Encapsulation with Polyethylene Glycol-modified and Unmodified Vesicles: Systemic and Microvascular Hemodynamics At 80% Blood Substitution. *Advances in Blood Substitutes: Industrial Opportunities and Medical Challenges*; Winslow, R. M., Vandegriff, K. D., Intaglietta, M., Eds.; Birkhäuser: Boston, 1997; 151–166.
37. Phillips, W. T.; Lemen, L.; Goins, B.; Rudolph, A. S.; Klipper, R.; Fresne, D.; Jerabek, P. A.; Emch, M. E.; Martin, C.; Fox, P. T.; McMahan, C. A. Use of Oxygen-15 to Measure Oxygen-carrying Capacity of Blood Substitutes In Vivo. *Am. J. Physiol.* 1997, 272, H2492–H2499.
38. Gabizon, A.; Price, D. C.; Huberty, J.; Bresalier, R. S.; Papahadjopoulos, D. Effect of Liposome Composition and Other Factors on the Targeting of Liposomes to Experimental Tumors; Biodistribution and Imaging Studies. *Cancer Res.* 1990, 50, 6371–6378.
39. Nelson, D. J. HemAssist: Development and Clinical Profile. *Red Blood Cell Substitutes: Basic Principles and Clinical Applications*; Rudolph, A. S., Rabinovici, R., Feuerstein, G. Z., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1998; 353–400.
40. Bakker, J. C.; Bleeker, W. K.; DenBoer, P. J.; Bicsels, P. T. M.; Agterberg, J.; Rigter, G.; Holthuis, J. C. M.; Mertens, K. Prevention of Side Effects by Hemoglobin Solutions; The Selection of Optimal Test Models, Especially Concerning Thrombogenicity. *Art. Cells Blood Subs. Immob. Biotech.* 1994, 22 (3), 577–585.
41. Feola, M.; Simoni, J.; Canizaro, P. C. Quality Control of Hemoglobin Solutions. I. The Purity of Hemoglobin Before Modification. *Art. Organs* 1991, 15 (3), 243–248.
42. Kang, Y.; Luo, R. G. Chromatographic Removal of Endotoxin from Hemoglobin Preparations: Effect of Solution Conditions on Endotoxin Removal Efficiency and Protein Recovery. *J. Chromatog. A* 1998, 809, 13–20.
43. Potts, B. J.; Kivens, W. J. Detecting and Removing Porcine Viruses to Prevent Contamination of Biopharmaceutical Raw Materials. *BioPharm* 2000, 13 (5), 26–31.
44. Shen, T. J.; Ho, N. T.; Zou, M.; Sun, D. P.; Cottan, P. F.; Simplaceanu, V.; Tam, M. F.; Bell, D. A., Jr.; Ho, C. Production of Human Normal Adult and Fetal Hemoglobin in *Escherichia Coli*. *Protein Eng* 1997, 10 (9), 1085–1097.
45. Nosé, Y. The Oxygenator. *Manual on Artificial Organs*; Mosby: St. Louis, 1973; Vol. 2.
46. Patel, M. J.; Webb, E. J.; Shelbourn, T. E.; Mattia-Goldberg, C.; George, A. J. T.; Zhang, F.; Moore, E. G.; Nelson, D. J. Absence of Immunogenicity of Diaspirin Cross-linked Hemoglobin in Humans. *Blood* 1998, 91 (2), 710–716.
47. DeAngeles, D. A.; Scott, A. M.; McGrath, A. M.; Korent, V. A.; Rodenkirch, L. A.; Conhaim, R. L.; Harms, B. A. Resuscitation from Hemorrhagic Shock With Diaspirin Cross-linked Hemoglobin, Blood, or Hetastarch. *J. Trauma* 1997, 42 (3), 406–414.
48. Siegel, J. H.; Fabian, M.; Smith, J. A.; Costantino, D. Use of Recombinant Hemoglobin Solution in Reversing

- Lethal Hemorrhagic Hypovolemic Oxygen Debt Shock. *J. Trauma* 1997, 42 (2), 199—212.
49. Kerger, H.; Tsai, A. G.; Saltzman, D. J.; Winslow, R. M.; Intaglietta, M. Fluid Resuscitation with O₂ Vs. Non-O₂ Carriers After 2 H of Hemorrhagic Shock in Conscious Hamsters. *Am. J. Physiol.* 1997, 272, H525-H537, (Heart Circ Physiol 41).
50. Conover, C. D.; Linberg, R.; Gilbert, C. W.; Shum, K. L.; Shorr, R. G. L. Effect of Polyethylene Glycol Conjugated Bovine Hemoglobin in Both Top—load and Exchange Transfusion Rat Models. *Artif. Organs* 1997, 21 (10), 1066—1075.
51. Draft Guidance for Industry (1): Efficacy Evaluation of Hemoglobin-and Perfluorocarbon-based Oxygen Carriers, Sept 8, 1997; U. S. Food and Drug Administration.
52. Gould, S. A.; Moore, E. E.; Moore, F. A.; Haenel, J. B.; Burch, J. M.; Sehgal, H.; Sehgal, L.; DeWoskin, R.; Moss, G. S.; Clinical Utility of Human Polymerized Hemoglobin As a Blood Substitute After Acute Trauma and Urgent Surgery. *J. Trauma* 1997, 43 (2), 325—332.
53. Gould, S. A.; Moore, E. E.; Hoyt, D. B.; Burch, J. M.; Haenel, J. B.; Garcia, J.; DeWoskin, R.; Moss, G. S. The First Randomized Trial of Human Polymerized Hemoglobin As a Blood Substitute in Acute Trauma and Emergent Surgery. *J. Am. Coll. Surg.* 1998, 187, 113—122.
54. Baron J. F. Berridge J. Brichant J. F. Demeyere R. Lamy M. Larbuisson R. Lehot J. J. Parsloe M. Sinclair C. J. Vandermeersch E. The DCLHb Collaborative Study Group, a Randomized Trial to Assess the Efficacy of Diaspirin Cross-linked Hemoglobin (DCLHb) Solution as an Alternative to Blood Transfusion Following Cardiac Surgery ASA Meeting San Diego October 20—22, 1997.
55. Sloan, E. P.; Doenigsberg, M.; Gens, D.; Cipolle, M.; Runge, J.; Mallory, M. N.; Rodman, G., Jr. DCLHb Traumatic Hemorrhagic Shock Study Group. Diaspirin Cross-linked Hemoglobin (DCLHb) in the Treatment of Severe Traumatic Hemorrhagic Shock; A Randomized Controlled Efficacy Trial. *JAMA* Nov 17, 1999, 282 (19), 1857—1864.
56. Adamson, J. G.; Bonaventura, B. J.; Er, S. S.; Langlois, S. F.; MacDonald, I. D.; Moore, C.; Pliura, D. H.; Rydall, J. R.; Wicks, D. G.; Wiffen, D. E.; Wojciechowski, P. W.; Wong, L. T.; Jones, R. T. Productions, Characterization, and Clinical Evaluation of Hemolink™, An Oxidized Raffinose Cross-linked Hemoglobin-based Blood Substitute. *Red Blood Cell Substitutes*, Rudolph, A. S., Rabinovici, R., Feuerstein, G. Z., Eds.; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1998; 335—352.
57. Kasper, S-M.; Walter, M.; Grüne, F.; Bischoff, A.; Erasmi, H.; Buzello, W. Effects of a Hemoglobin-based Oxygen Carrier (HBOC-201) on Hemodynamics and Oxygen Transport in Patients Undergoing Preoperative Hemodilution for Elective Abdominal Aortic Surgery. *Anesth. Analg.* 1996, 83, 921—927.
58. Standl, T.; Burmeister, M-A.; Horn, E-P.; Wilhelm, S.; Knoefel, W. T.; Schulte am Esch, J. Bovine Hemoglobinbased Oxygen Carrier for Patients Undergoing Haemodilution Before Liver Resection. *Brit. J. Anaesth* 1998, 80, 189—194.
59. Kasper, S. -M.; Grüne, F.; Walter, M.; Amr, N.; Erasmi, H.; Buzello, W. The Effects of Increased Doses of Bovine Hemoglobin on Hemodynamics and Oxygen Transport in Patients Undergoing Preoperative Hemodilution for Elective Abdominal Aortic Surgery. *Anesth. Analg.* 1998, 87, 284—291.
60. Brauer, P.; Standl, T.; Wilhelm, S.; Burmeister, M. -A.; Schulte am Esch, J. Transcranial Doppler Ultrasonography Mean Flow Velocity During Infusion of Ultrapurified Bovine Hemoglobin. *J. Neurosurg. Anesthes* 1998, 10 (3), 146—152.
61. Wahr, J. A.; Anderson, M. M.; Giacherio, D. A.; Hallock, L.; Gawryl, M. S.; Lansden, C.; Tremper, K. K. The Effects of a Blood-salvaging Device on Blood Containing a Hemoglobin-based Oxygen Carrier, HBOC-201. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesthes.* 1997, 11 (1), 10—12.
62. Neya, K.; Lee, R.; Vlahakes, G. J. Hemoglobin Based Oxygen Carrying Solution Stability in Extracorporeal Circulation; An In Vitro Evaluation and Implications for Clinical Use. *ASAIO J.* 1998, 44, 166—170.
63. McGown, E. L.; Lyons, M. F.; Marini, M. A.; Zegna, A. Reduction of Extracellular Methemoglobin by Erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1990, 1036, 202—206.
64. Darling, R.; Roughton, F. J. W. The Effect of Methemoglobin on the Equilibrium Between Oxygen and Hemoglobin. *Am. J. Physiol.* 1942, 137, 56—68.
65. Bone, R. C. Sepsis and Its Complications; The Clinical Problem. *Crit. Care Med.* 1994, 22, S8—S11.
66. Fitzgerald, R. D.; Martin, C. M.; Dietz, G. E.; Doig, G. S.; Potter, R. F.; Sibbald, W. J. Transfusing Red Blood Cells Stored in Citrate Phosphate Dextrose Adenine-1 for 28 Days Fails to Improve Tissue Oxygenation in Rats. *Crit. Care Med.* 1997, 25 (5), 726—732.
67. Heneka, M. T.; Löschmann, P. -A.; Osswald, H. Pol-

- mymerized Hemoglobin Restores Cardiovascular and Kidney Function in Endotoxin-induced Shock in the Rat. *J. Clin. Invest.* 1997, 99, 47–54.
68. Fischer, S. R.; Bone, H. G.; Powell, W. C.; McGuire, R.; Traber, L. D.; Traber, D. L. Pyridoxalated Hemoglobin Polyoxyethylene Conjugate Does Not Restore Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction in Ovine Sepsis. *Crit. Care Med.* 1997, 25 (9), 1551–1559.
 69. Bone, H. G.; Schenarts, P. J.; Booke, M.; McGuire, R.; Harper, D.; Traber, L. D.; Traber, D. L. Oxalated Pyridoxalated Hemoglobin Polyoxyethylene Conjugate Normalizes the Hyperdynamic Circulation in Septic Sheep. *Crit. Care Med.* 1997, 25 (6), 1010–1018.
 70. DeAngelo, J. Nitric Oxide Scavengers in the Treatment of Shock Associated With Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Exp. Opin. Pharmacother* 1999, 1 (1), 19–29.
 71. Reah, G.; Bodenham, A. R.; Mallick, A.; Daily, E. K.; Przybelski, R. J. Initial Evaluation of Diaspirin Crosslinked Hemoglobin (DCLHb™) as a Vasopressor in Critically Ill Patients. *Crit. Care Med.* 1997, 25 (9), 1480–1488.
 72. Vaupel, P. *Oxygenation of Solid Tumors. Drug Resistance in Oncology*, Teicher, B. A., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1993; 53–85.
 73. Vaupel, P. *Oxygenation of Human Tumors. Strahlenther. Onkol.* 1990, 166, 377–386.
 74. Teicher, B. A.; Ara, G.; Herbst, R.; Takeuchi, H.; Keyes, S.; Northey, D. PEG-Hemoglobin Effects On Tumor Oxygenation and Response to Chemotherapy In Vivo 1997, 11, 301–312.
 75. Teicher, B. A.; Dupuis, N. P.; Liu, F.; Robinson, M. F.; Menon, K. Administration of a Hemoglobin Solution Decreases Hypoxia and Increases Radiation Response in a Rat Mammary Carcinoma Model. *Drug Development Res.* 1995, 34, 231–240.
 76. Teicher, B.; Ara, G.; Chen, Y.; Emi, Y.; Kakeji, Y.; Ikebe, M.; Machara, Y. PEG-Hemoglobin Effects on Tumor Oxygenation and Radiosensitization. *Rad. Oncol. Invest* 1996, 4 (5), 200–210.
 77. Moqattash, S.; Lutton, J. D.; Rosenthal, G.; Abu-Hijleh, M. F.; Abraham, N. G. Effect of Blood Substitute, Recombinant Hemoglobin, on in Vivo Hematopoietic Recovery from AZT Toxicity. *Acta Haematol.* 1997, 98, 76–82.
 78. Lutton, J. D.; Jiang, S.; Drummond, G. S.; Abraham, N. G.; Levere, R. D.; Kappas, A. Pharmacologic Effects of the Red Blood Cell Substitutes Cross-linked and Non-crosslinked Hemoglobins on Hematopoiesis in Rabbits. *Pharmacol.* 1999, 58, 319–324.
 79. Cohn, S. M. *Blood Substitutes. New Horiz.* 1999, 7 (1), 54–60.
 80. Bowes, M. P.; Burhop, K. E.; Ziven, J. A. Diaspirin Crosslinked Hemoglobin Improves Neurological Outcome Following Reversible But Not Irreversible CNS Ischemia in Rabbits. *Stroke* 1994, 25 (11), 2253–2257.
 81. Aronowski, J.; Strong, R.; Grotta, J. C. Combined Neuroprotection and Reperfusion Therapy for Stroke. Effect of Lubeluzole and Diaspirin Cross-linked Hemoglobin in Experimental Focal Ischemia. *Stroke* 1996, 27 (9), 1571–1577.
 82. Cole, D. J.; Schell, R. M.; Przybelski, R. J.; Drummond, J. C.; Bradley, K. Focal Cerebral Ischemia in Rats: Effect of Hemodilution With α - α Cross-linked Hemoglobin on CBF. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1992, 12, 971–976.
 83. Cole, D. J.; Drummond, J. C.; Patel, P. M.; Marcantonio, S. Effects of Viscosity and Oxygen Content on Cerebral Blood Flow in Ischemic and Normal Rat Brain. *J. Neurol. Sci.* 1994, 124, 15–20.
 84. Cole, D. J.; Schell, R. M.; Drummond, J. C.; Reynolds, L. Focal Cerebral Ischemia in Rats: Effect of Hypervolemic Hemodilution With Diaspirin Cross-linked Hemoglobin Versus Albumin on Brain Injury and Edema. *Anesthesiology* 1993, 78, 335–342.
 85. Cole, D. J.; Drummond, J. C.; Patel, P. M.; Nary, J. C.; Applegate, R. L., II. Effect of Oncotic Pressure of Diaspirin Cross-linked Hemoglobin (DCLHb™) on Brain Injury After Temporary Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Anesth. Analg.* 1996, 83, 342–347.
 86. Hanzawa, K.; Ohzeki, H.; Moro, H.; Eguchi, S.; Nakajima, T.; Makifuchi, T.; Miyashita, K.; Nushiura, M.; Naritomi, H. Effects of Partial Blood Replacement With Pyridoxalated Hemoglobin Polyoxyethylene Conjugate Solution on Transient Cerebral Ischemia in Gerbil. *Art. Cells Blood Subs. Immob. Biotech.* 1997, 25 (1, 2), 105–114.
 87. Medele, R. J.; Stummer, W.; Reulen, H. J.; Steiger, H. J. Evidence for Peroxidative Damage by Nitric Oxide in Experimental Chronic Cerebral Vasospasm. *Neurol. Res.* 1996, 18, 277–280.
 88. Cole, D. J.; Nary, J. C.; Drummond, J. C.; Patel, P. M.; Jacobsen, W. K. α - α Diaspirin Cross-linked Hemoglobin, Nitric Oxide and Cerebral Ischemic Injury in Rats. *Art. Cells Blood Subs. Immob. Biotech.* 1997, 25 (1, 2), 141–152.
 89. Kassell, N. F.; Torner, J. C.; Hale, E. C., Jr.; Jane, J. A.; Adams, H. P.; Kongable, G. L. The International



- al Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 1: Overall Management Results. *J. Neurosurg.* 1990, 73, 18—36.
90. Macdonald, R. L.; Weir, B. K. A. A Review of Hemoglobin and the Pathogenesis of Cerebral Vasospasm. *Stroke* 1991, 22, 971—982.
91. Cole, D. J.; McKay, L.; Jacobsen, W. K.; Drummond, J. C.; Patel, P. M. Effect of Subarachnoid Administration of α - α Diaspirin Cross-linked Hemoglobin on Cerebral Blood Flow in Rats. *Art. Cells Blood Subs. Immunob. Biotech.* 1997, 25 (1, 2), 95—104.
92. Saxena, R.; Wijnhoud, A. D.; Man in 't Veld, A. J.; van den Meiracker, A. H.; Boomsma, F.; Przybelski, R. J.; Koudstaal, P. J. Effect of Diaspirin Cross-linked Hemoglobin on Endothelin-1 and Blood Pressure in Acute Ischemic Stroke in Man. *J. Hypertens.* 1998, 16, 1459—1465.
93. Arent, R. M.; Schmoekel, M.; Wilbert-Lampen, U.; Plasse, A.; Heucke, L.; Werdan, K. Bidirectional Effects of Endogenous Opioid Peptides on Endothelin Release Rates in Porcine Aortic Endothelial Cell Culture: Mediation by Delta Opioid Receptor Antagonist-Insensitive Mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995, 272, 1—7.
94. Anderson, V. H.; Nelson, D. I.; Leingruber, P. P.; Roubin, G. S.; Gruentzig, A. R. Coronary Artery Perfusion during Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty. *Transfusion Medicine: Recent Technological Advances*; Alan R Liss: New York, 1986; 3—20.
95. Christensen, C. W.; Reeves, W. C.; Lassar, T. A.; Schmidt, D. H.; Inadequate Subendocardial Oxygen Delivery during Perfluorocarbon Perfusion in a Canine Model of Ischemia. *Am. Heart J.* 1988, 115, 30—37.
96. McKenzie, J. E.; Cost, E. A.; Scandling, D. M.; Ahle, N. W.; Savage, R. W. Effects of Diaspirin Cross-linked Haemoglobin during Coronary Angioplasty in the Swine. *Cardiovasc. Res.* 1994, 28, 1188—1192.
97. Gonzalez, P.; Hackney, A. C.; Jones, S.; Strayhorn, D.; Hoffman, E. B.; Hughes, G.; Jacobs, E. E.; Orringer, E. P. A Phase I/II Clinical Study of Polymerized Bovine Hemoglobin in Adult Patients with Sick Cell Disease not in Crisis at the Time of Study. *J. Invest. Med.* 1997, 45 (5), 258—264.
98. Hughes, G. P.; Yancey, E. P.; Albrecht, R.; Locker, P. K.; Francome, S. F.; Orringer, E. P.; Antal, E. J.; Jacobs, E. E. Hemoglobin-based Oxygen Carrier Preserves Submaximal Exercise Capacity in Humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1995, 58, 434—443.
99. Elsayed, N. M.; Gorbunov, N. V.; Kagan, V. E. A Proposed Biochemical Mechanism Involving Hemoglobin for Blast Overpressure-induced Injury. *Toxicology* 1997, 121, 81—90.
100. Cohn, S. M.; Zieg, P. M.; Rosenfield, A. T.; Fisher, B. T. Resuscitation of Pulmonary Contusion: Effects of a Red Cell Substitute. *Crit. Care Med.* 1997, 25 (3), 484—491.
101. Shackford, S. R. Effect of Small-Volume Resuscitation on Intracranial Pressure and Related Cerebral Variables. *J. Trauma* 1997, 42 (5), S48—S53.
102. Piper, I. R.; Garrioch, M. A.; Souter, M. J.; Andrews, P. J. D.; Thomson, D. Effects of Diaspirin Cross linked Haemoglobin on Post-traumatic Cerebral Perfusion Pressure and Blood Flow in a Rodent Model of Diffuse Brain Injury. *Brit. J. Anaesthes.* 1998, 80, 639—643.
103. Nary, J.; Ling, G.; Lojeski, E.; Muldoon, S. Traumatic Brain Injury in Rats: Histopathologic Effects of Hemodilution with Diaspirin Crosslinked Hemoglobin. *Anesthesiol* 1997, 87 (3A), A 681.
104. Wallace, W. J.; Houtchens, R. A.; Maxwell, J. C.; Caughey, W. S. Mechanism of Autoxidation for Hemoglobins and Myoglobins. *J. Biol. Chem.* 1982, 257 (9), 4966—4976.
105. Watkins, J. A.; Kawanishi, S.; Caughey, W. S. Autoxidation Reactions of Hemoglobin a Free from Other Red Cell Components a Minimal Mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985, 132 (2), 742—748.
106. Ortiz, M. C.; Fortepiani, L. A.; de Rycker, M.; Atucha, N. M.; Romero, J. C.; Garcia-Están, J. Pressor and Renal Effects of Cross-linked Hemoglobin in Anesthetized Cirrhotic Rats. *J. Hepatol.* 2000, 32, 32—37.
107. Chou, A. C.; Fitch, C. D. Mechanism of Hemolysis Induced by Ferriprotoporphyrin IX. *J Clin Invest* 1981, 68, 672—677.
108. Balla, G.; Vercellotti, G. M.; Muller-Eberhard, U.; Eaton, J.; Jacob, H. S. Exposure of Endothelial Cells to Free Heme Potentiates Damage Mediated by Granulocytes and Toxic Oxygen Species. *Lab. Invest.* 1991, 64, 648—655.
109. D'Agnillo, F.; Alayash, A. I. Site-Specific Modifications and Toxicity of Blood Substitutes. The Case of Diaspirin Cross-linked Hemoglobin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000, 40, 199—212.
110. Alayash, A. I. Hemoglobin-based Blood Substitutes: Oxygen Carriers, Pressor Agents, or Oxidants? *Nature Biotech.* 1999, 17, 545—549.
111. Alayash, A. I.; Ryan, B. A. B.; McLeod, L. L.; Gold-



- man, D. W.; Cashon, R. E. Cell-free Hemoglobin and Tissue Oxidants; Probing the Mechanisms of Hemoglobin Cytotoxicity. *Blood Substitutes, Principles, Methods, Products and Clinical Trials*; Chang, T. M. S., Ed.; Karger Landes Systems: Basel, 1998; 157–177.
112. Everse, J.; Nelson, H. The Toxicities of Native and Modified Hemoglobins. *Free Rad. Biol. Med.* 1997, 22 (6), 1075–1099.
113. Caron, A.; Menu, P.; Faivre-Fiorina, B.; Labrude, P.; Alayash, A. I.; Vigneron, C. Cardiovascular and Hemorheological Effects of Three Modified Human Hemoglobin in Hemodiluted Rabbits. *J. Appl. Physiol.* 1999, 86 (2), 541–548.
114. Loscalzo, J.; Welch, G. Nitric Oxide and the Cardiovascular System. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 1995, 38, 87–104.
115. Davies, M. G.; Fulton, G. J.; Hagen, P. -O. Clinical Biology of Nitric Oxide. *Brit. J. Surg.* 1995, 82, 1598–1610.
116. Takaori, K.; Inoue, K.; Kogire, M.; Higashide, S.; Tun, T.; Aung, T.; Doi, R.; Fujii, N.; Tobe, T. Effects of Endothelin on Microcirculation of the Pancreas. *Life Sci.* 1992, 51, 615–622.
117. Kohan, D. E. Endothelins in the Normal and Diseased Kidney. *Am. J. Kidney Dis.* 1997, 29 (1), 2–26.
118. Kerger, H.; Tsai, A. G.; Saltzman, D. J.; Winslow, R. M.; Intaglietta, M. Fluid Resuscitation with O₂ Vs. Non-O₂ Carriers After 2 H of Hemorrhagic Shock in Conscious Hamsters. *Am. J. Physiol.* 272, H525–H537.
119. Xu, L.; Sun, L.; Rollwagen, F. M.; Li, Y.; Pacheco, N. D.; Pikoulis, E.; Leppaniemi, A.; Soltero, R.; Burris, D.; Malcolm, D.; Nielsen, T. B. Cellular Responses to Surgical Trauma, Hemorrhage, and Resuscitation with Diaspirin Cross-linked Hemoglobin in Rats. *J. Trauma* 1997, 42 (1), 32–41.
120. Noone, R. B., Jr.; Mythen, M. G.; Vaslef, S. N. Effect of α - α Cross-linked Hemoglobin and Pyridoxalated Hemoglobin Polyoxyethylene Conjugate Solutions on Gastrointestinal Regional Perfusion in Hemorrhagic Shock. *J. Trauma* 1998, 45 (3), 457–469.
121. Von Dobschuetz, E.; Hoffmann, T.; Messmer, K. Diaspirin Cross-linked Hemoglobin Effectively Restores Pancreatic Microcirculatory Failure in Hemorrhagic Shock. *Anesthesiol.* 1999, 91, 1754–1762.
122. Schultz, S. C.; Powell, C. C.; Bernard, E. Diaspirin Crosslinked Hemoglobin (DCLHb™) Attenuates Bacterial Translocation in Rats. *Art. Cells Blood Subs. Immob. Biotech.* 1995, 23, 647.
123. Bone, H. G.; Schenarts, P. J.; Fischer, S. R.; McGuire, R.; Traber, L. D.; Traber, D. L. Pyridoxalated Hemoglobin Polyoxyethylene Conjugate Reverses Hyperdynamic Circulation in Septic Sheep. *J. Appl. Physiol.* 1998, 84 (6), 1991–1999.
124. Gulati, A.; Sharma, A. C.; Singh, G. Role of Endothelin in the Cardiovascular Effects of Diaspirin Cross-linked and Stroma-reduced Hemoglobin. *Crit. Care Med.* 1996, 24 (1), 137–147.
125. Loeb, A.; McIntosh, L. J.; Raj, N. R.; Longnecker, D. Regional Vascular Effects of RHb 1.1, a Hemoglobin-based Oxygen Carrier. *J. Cardiovasc. Pharm.* 1997, 30, 703–710.
126. Viele, M. K.; Weiskopf, R. B.; Fisher, D. Recombinant Human Hemoglobin does not Affect Renal Function in Humans; Analysis of Safety and Pharmacokinetics. *Anesthesiol* 1997, 86 (4), 48–58.
127. Murray, J. A.; Ledlow, A.; Launspach, J.; Evans, D.; Loveday, M.; Conklin, J. L. The Effects of Recombinant Human Hemoglobin on Esophageal Motor Function in Humans. *Gastroenterol* 1995, 109, 1241–1248.
128. For Example, See Refs. (41) and (42).
129. Takaori, K.; Inoue, K.; Kogire, M.; Higashide, S.; Tun, T.; Aung, T.; Doi, R.; Fujii, N.; Tobe, T. Effects of Endothelin on Microcirculation of the Pancreas. *Life Sci.* 1992, 51, 615–622.
130. Gburek, J.; Zabel, M.; Osada, J. Immunohistochemical Localization of Haemoglobin Binding Sites in the Distal Tubule of the Rat Kidney. *Histochem. J.* 1998, 30, 421–424.
131. Lorente, J. A.; Landin, L.; Renes, E.; DePablo, R.; Jorge, P.; Rodena, E.; Liste, D. Role of Nitric Oxide in the Hemodynamic Changes of Sepsis. *Crit. Care Med.* 1993, 21, 759–767.
132. Thiernemann, C.; Szabo, C.; Mitchell, J. A.; Vane, J. R. Vascular Hyporeactivity to Vasoconstrictor Agents and Hemodynamic Decompensation in Hemorrhagic Shock is Mediated by Nitric Oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993, 90, 267–271.
133. Petros, A.; Lamb, G.; Leone, A.; Moncada, S.; Bennett, D.; Valance, P. Effects of a Nitric Oxide Synthase Inhibitor in Humans With Septic Shock. *Cardiovasc. Res.* 1994, 28, 34–39.
134. Bush, S.; Marshall, T.; Spicuzza, J.; Nelson, D. Diaspirin Cross-linked Hemoglobin (DCLHb™); Bioanalytical Studies in Swine. *Art. Cells Blood Subs. Immob. Biotech.* 1994, 22 (3), 917–922.
135. Sibbald, W. J.; Sielenkamper, A. Blood Substitutes—

- Effects on the Microcirculation. Update Intensive Care Emerg. Med. 1998, 33, 318—331.
136. Pincemail, J.; Detry, O.; Philippart, C.; Defraigne, J. O.; Franssen, C.; Burhop, K.; Deby, C.; Meurisse, M.; Lamy, M. Diaspirin Crosslinked Hemoglobin (DCLHb™): Absence of Increased Free Radical Generation Following Administration in a Rabbit Model of Renal Ischemia and Reperfusion. Free Rad. Biol. Med. 1995, 19 (1), 1—9.
137. Bratlid, D. Bilirubin Toxicity: Pathophysiology and Assessment of Risk Factors. New York State J. Med. 1991, 91 (11), 489—492.
138. McDounagh, A. F. Is Bilirubin Good for You? Clin. Perinatol. 1990, 17, 359—369.
139. Tithof, P.; Estep, T.; Burhop, K. Diaspirin Cross-linked Hemoglobin; Safety and Pre-clinical Profile of a Novel Hemoglobin Therapeutic in Preparation.
140. Vemulapalli, S.; Chiu, P. J. S.; Grisetti, K.; Brown, A.; Kurowski, S.; Sybertz, E. J. Phosphoramidon Does Not Inhibit Endogenous Endothelin-1 Release Stimulated by Hemorrhage, Cytokines and Hypoxia in Rats. Eur. J. Pharmacol. 1994, 257, 95—102.
141. Chang, H.; Wu, G.-J.; Wang, S.-M.; Hung, C. Plasma Endothelin Level Changes During Hemorrhagic Shock. J. Trauma 1993, 35, 825—833.
142. Hlaváček, J.; Marco, R. Biological Function and Chemistry of Endothelin. A Review. Collect Czech. Chem. Commun. 1999, 64, 1211—1252.
143. Gulati, A.; Sen, A. P.; Sharma, A. C.; Singh, G. Role of ET and NO in Resuscitative Effect of Diaspirin Cross-linked Hemoglobin after Hemorrhage in Rat. Am. J. Physiol. 1997, 273, H817—H836.
144. Ledvina, M. A.; Hart, J.; Bina, S.; Jing, M.; Muldoon, S. Endothelin Plays a Role in Contractions of Isolated Pig Pulmonary Vessels Induced by Diaspirin Cross-linked Hemoglobin. J. Lab. Clin. Med. 1999, 133, 478—487.
145. Gulati, A.; Singh, G.; Rebello, S.; Sharma, A. C. Effect of Diaspirin Cross-linked and Stroma-reduced Hemoglobin on Mean Arterial Pressure and Endothelin-1 Concentration in Rats. Life Sci. 1995, 56, 1433—1442.
146. Gulati, A.; Sharma, A. C.; Singh, G. Role of Endothelin in the Cardiovascular Effects of Diaspirin Cross-linked and Stroma Reduced Hemoglobin. Crit. Care Med. 1996, 24, 137—147.
147. Schultz, S. C.; Grady, B.; Cole, F.; Hamilton, I.; Burhop, K.; Malcolm, D. S. A Role for Endothelin and Nitric Oxide in the Pressor Response to Diaspirin Crosslinked Hemoglobin. J. Lab. Clin. Med. 1993, 122, 301—308.
148. Warshaw, A. L.; O'Hara, P. J. Susceptibility of the Pancreas to Ischemic Injury in Shock. Ann. Surg. 1978, 188, 197—201.
149. Hasdai, D.; Komowski, R.; Battler, A. Endothelin and Myocardial Ischemia. Cardiovasc. Drugs. Ther. 1994, 8, 589—599.
150. Wieszczored, I.; Haynes, W. G.; Webb, D. J.; Ludlam, C. A.; Fox, K. A. Raised Plasma Endothelin in Unstable Angina and Non-Q Wave Myocardial Infarction: Relation to Cardiovascular Outcome. Br. Heart J. 1994, 72, 436—441.
151. McMurray, J. J.; Ray, S. G.; Abdullah, I.; Dargie, H. J.; Morton, J. J. Plasma Endothelin in Chronic Heart Failure. Circulation 1992, 85, 1374—1379.
152. Godfraind, T.; Salomone, S. Calcium Antagonists and Endothelial Function: Focus on Nitric Oxide and Endothelin. Cardiovasc. Drugs Ther. 1996, 10 (4), 439—446.
153. Davis, J. H.; Yull, A. B. A Possible Toxic Factor in Abdominal Injury. J. Trauma 1961, 2, 291—300.
154. Eaton, J. R. Haptoglobin: A Natural Bacteriostat. Science 1982, 215, 691—692.
155. Lee, J. T., Jr.; Ahrenholz, D. H.; Nelson, R. D.; Simmons, R. L.; Mechanisms of the Adjuvant Effect of Hemoglobin in Experimental Peritonitis. V. The Significance of the Coordinated Iron Component. Surgery 1979, 86 (1), 41—48.
156. Baldwin, A. Blood Substitutes and the Intestinal Microcirculation: Extravasation and Ultrastructural Alterations. Advances in Blood Substitutes; Industrial Opportunities and Medical Challenges; Winslow, R. M., Vandegriff, K. D., Intaglietta, M., Eds.; Birkhäuser: Boston, 1997; 19—37.
157. Ziegler, T. R.; Smith, R. J.; O'Dwyer, S. T.; Demling, R. H.; Wilmore, D. W. Increased Intestinal Permeability Associated with Infection in Burn Patients. Arch. Surg. 1988, 123, 1313—1319.
158. Langkamp-Henken, B.; Donovan, T. B.; Pate, L. M.; Maull, C. D.; Kudsk, K. A. Increased Intestinal Permeability Following Blunt and Penetrating Trauma. Crit. Care Med. 1995, 23, 660—664.
159. Riddington, D. W.; Venkatesh, B.; Boivin, C. M. Intestinal Permeability, Gastric Intramucosal PH, and Systemic Endotoxemia in Patients Undergoing Cardiopulmonary Bypass. J. Am. Med. Assoc. 1996, 275, 1007—1012.
160. Deitch, E. A. The Role of Intestinal Barrier Failure and Bacterial Translocation in the Development of Systemic

- Infection and Multiple Organ Failure. Arch. Surg. 1990, 125, 403—404.
161. Doglio, G. R.; Pusajo, J. F.; Egurola, M. A. Gastric Mucosal PH as a Prognostic Index of Mortality in Critically Ill Patients. Crit. Care Med. 1991, 19, 1037—1040.
 162. Ivatury, R. R.; Simon, R. J.; Islam, S.; Fueg, A.; Rohman, M.; Stahl, W. M. A Prospective Randomized Study of End Points of Resuscitation after Major Trauma: Global Oxygen Transport Indices Versus Organ-specific Gastric Mucosal PH. J. Am. Coll. Surg. 1996, 183, 145—154.
 163. Salzman, A. I.; Wang, H.; Wollert, P. S. Endotoxin-Induced Ileal Mucosal Hyperpermeability in Pigs: Role of Tissue Acidosis. Am. J. Physiol. 1994, 266, G633—G646.
 164. Bark, T.; Katouli, M.; Ljungqvist, O. Bacterial Translocation after Non-Lethal Hemorrhage in the Rat. Circ. Shock 1993, 41, 60.
 165. Fitzgerald, R. D.; Martin, C. M.; Dietz, G. E.; Doig, G. S.; Potter, R. F.; Sibbald, W. J. Transfusing Red Blood Cells Stored in Citrate Phosphate Dextrose Adenine-1 for 28 Days Fails to Improve Tissue Oxygenation in Rats. Crit. Care Med. 1997, 25 (5), 726—732.
 166. Xu, L.; Sun, L.; Rollwagen, F. M.; Li, Y.; Pacheco, N. D.; Pikoulis, E.; Leppäniemi, A.; Soltero, R.; Burris, D.; Malcolm, D.; Nielsen, T. B. Cellular Responses to Surgical Trauma, Hemorrhage, and Resuscitation with Diaspirin Cross-linked Hemoglobin in Rats. Trauma 1997, 32—41.
 167. Langermans, J. A. M.; Bleeker, W. K. Haemoglobin-based Blood Substitutes and Infection. Lancet 1995, 345, 863—864.
 168. Sinassappel, M.; Ince, C. Low Volume Resuscitation With a Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Following Hemorrhage Improves Gut Microvascular Oxygenation in Pigs. J. Appl. Physiol. 1996, 81, 2297—2303.
 169. Bornside, G. H.; Bouis, P. J.; Cohn, I., Jr. Enhancement of *E. Coli* Infection and Endotoxic Activity by Hemoglobin and Ferric Ammonium Citrate. Surgery 1970, 68, 350—355.
 170. Griffiths, E.; Cortes, A.; Gilbert, N.; Stevenson, P.; MacDonald, S.; Pepper, D. Haemoglobin-based Blood Substitutes and Sepsis. Lancet 1995, 345, 158—160.
 171. Su, D.; Roth, R. I.; Yoshida, M.; Levin, J. Hemoglobin Increases Mortality from Bacterial Endotoxin. Infect. Immun. 1997, 65 (4), 1258—1266.
 172. Langermans, J. A. M.; van Vuren-van der Hulst, M. E. B.; Bleeker, W. K. Safety Evaluation of a Polymerized Hemoglobin Solution in a Murine Infection. Model. J. Lab. Clin. Med. 1996, 127, 428—434.
 173. Mourelatos, M. G.; Enzer, N.; Ferguson, J. L. The Effects of Diaspirin Cross-linked Hemoglobin in Sepsis. Shock 1996, 5, 141—148.
 174. Sielenkämper, A. W.; Chin-ye, I. H.; Martin, C. M.; Sibbald, W. J. Diaspirin Cross-linked Hemoglobin Improves Systemic Oxygen Uptake in Oxygen-supply-dependent Septic Rats. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997, 156, 1066—1072.
 175. Bone, H. G.; Booke, M.; Schenarts, P. J.; O'Connor, M.; Traber, L. D.; Traber, D. L. Comparison of Different Doses of Pyridoxalated Hemoglobin Polyoxyethylene Conjugate in the Treatment of Hyperdynamic Sepsis. Crit. Care Med. 1996, 24 (Suppl.), A27.
 176. Birnbaum, M. L. B.; Lipman, J.; Garrioch, M. Diaspirin Cross-linked Hemoglobin (DCLHb) Vs. Blood in Acutely Anemic Patients. Int. Care Med. 1997, 23 (Suppl. 1), S85, Abstract 263.
 177. Bunn, H. F.; Forget, B. G. Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects; W. B. Saunders Co; Philadelphia, 1986.
 178. Rudolph, A. S.; Rabinovici, R.; Feuerstein, G. Z., Eds. Red Blood Cell Substitutes: Basic Principles and Clinical Applications; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1997.
 179. Nelson, D. J. Blood Substitutes: Hemoglobin-based Oxygen Carriers. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.; New York, 2000; Vol. 19, 1—33.

(盛民立 张小红 译)

X

X 射线粉末衍射法^①

Raj Suryanarayanan

University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, U. S. A.

Suneel Rastogi

Forest Laboratories, Inc., Inwood, New York, U. S. A.

引言

在电磁波谱中, X 射线是位于紫外线与 γ 射线之间的一种电磁辐射。通常将 X 射线的波长范围定为 $0.01 \sim 100 \text{ \AA}$ 。^[1]

在材料描述方面, X 射线主要应用于以下两方面, X 射线荧光光谱和 X 射线衍射。X 射线荧光光谱可用于化学分析, 但很少用于药物的描述。X 射线衍射通过对结晶性物质结构的研究可以更深一步用于固态药物性状的表达。X 射线衍射又有两方面主要应用, 一是 X 射线结晶学, 用于确定结晶结构, 通常需用单个结晶; 另一是粉末 X 射线衍射, 试样为粉末状。X 射线粉末衍射法是判断晶相的强有力的检测手段, 也可用于固态成分的定量分析。本章主要介绍 X 射线粉末衍射法的原理及其在药物分析中的应用。

衍射是一种散射现象。当 X 射线按一定方向投射到晶体上时, 它会向各个方向发生散射, 并在某些方向相干加强, 形成衍射光^[1,2]。布拉格公式描述了衍射发生的条件, 当完全平行的单色 X 射线其波长为 λ 、以 θ 角入射到一结晶试样时, 如果:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (1)$$

则产生衍射。式中: d 为晶格面间距, 以 \AA 表示; n 为反射级数整数。

X 射线粉末衍射图可用衍射仪或照相机获取。此法已在药物分析中被广泛应用且不破坏样品。本文对于粉末衍射法的原理及操作不做讨论。实际上, X 射线粉末衍射法也常用于固态药物分析^[1~4]。目前, 关于 X 射线粉末衍射法在药物分析方面应用的报道并不多。美国药典对 X 射线衍射法做了简洁而详尽的描述^[5], 包括应用于固态药物的物理描述^[6]及控释制剂方面的描述^[7]。

定性分析

由于每一种化合物的晶体都有它独特的 X 射线衍射图形, 该技术广泛用于固相鉴别与性状描述。X 射线衍射法可以用于区分化合物的多晶型 (图 1)^[8]。而且还可以通过晶格内部的不同而识别出溶剂化物与非溶剂化物。该技术

也可揭示不同的结晶化合物。无定形化合物的 X 射线衍射图谱是由一个或几个宽峰组成的 [图 2(a)]^[9]。

X 射线衍射法在美国药典中记载有氨苄西林的两种无水物 (1 型、2 型)、氨苄西林三水物和无定形氨苄西林无水物^[5]。这四种固相物质有其不同的 X 射线衍射图谱, 可用于对它们的鉴别。

X 射线衍射法对于识别 AG337 (一种 5 位取代的盐酸噻唑啉酮) 的不同晶型是一强有力的工具。除了几种多晶态的无水物 ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS} \cdot 2\text{HCl}$) 外, 该化合物还存在半水合物 ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS} \cdot 2\text{HCl} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$)、一水合物 ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS} \cdot 2\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$) 和二水合物 ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS} \cdot 2\text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)^[8]。半水合物和二水合物以及其中一种无水物具有同样的晶格结构 (图 1)。

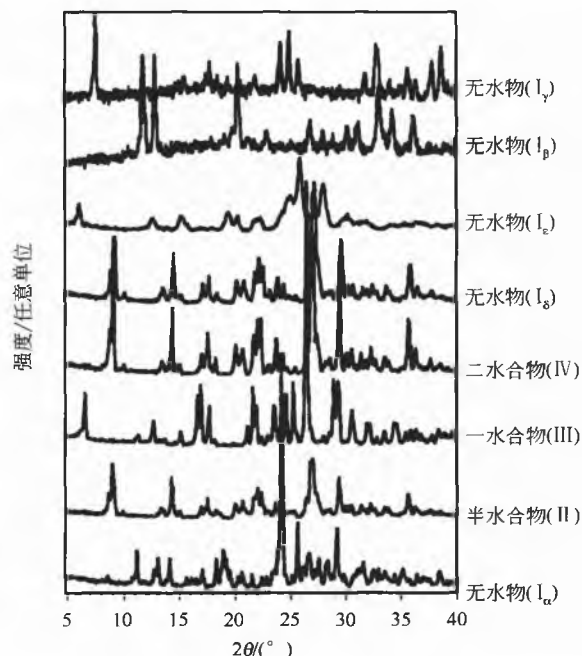


图 1 AG337 不同固相的 X 射线衍射图谱

采用 X 射线衍射法可以很容易区别蔗糖的无定形与晶型 [图 2(a)], 该技术也可用于分辨无定形蔗糖中混有少

① 本章转载了“X 射线粉末衍射法”的部分内容, R. Suryanarayanan 所写的“X 射线粉末衍射法”载于由 H. Brittain 编辑的“药物制剂的物理描述”中。汇总于由 J. Swarbrick 编辑的“药物科学”第 70 卷, Marcel Dekker, Inc., New York, 1995。

X

表1卡片上区域1为粉末衍射文件(PDF)的号码。区域2为数据质量的标记。区域3为分子式和样品名称。区域4为获得粉末衍射数据的试验条件及数据来源。区域5为样品的结晶学数据。区域6为普通注释,包括结晶学数据单元(如果和区域5不一致)、Pearson符号代码(PSC)、Merck Index号码等。区域7为晶面间距、相对强度及密勒指数。

关于数据的质量有一些指示符号,最佳质量指示符号为“*”。只有化合物的化学性质有明显特征才能标上这样的标记,X射线衍射图谱强度必须客观地用仪器测定,而且必须偏入索引、没有空间群熄灭或任何杂质峰。若晶面间距小于或等于 2.50\AA ,谱线的晶面间距至少要有三位有效数字。若质量指示符号为“i”,则X射线衍射图谱中除最强的八根谱线外,可以有两根未经索引、丰度减弱或杂质峰,且无严重的系统错误。若晶面间距小于或等于 2.00\AA ,谱线的晶面间距至少要有三位有效数字。若质量指示符号为“O”,即表示该数据精密度较低,由于特征性较差,或者是多相系统。若不符“*”、“i”和“O”的要求,则任其空缺。当用结构参数计算粉末图时,标记为“C”。关于质量标记指南的详细资料可以查阅ICDD出版物^[12]。

另外一个关于药物的重要的数据库是由剑桥结晶数据中心编写的剑桥结构数据库(CSD)。CSD主要编写单相结构信息,包括单晶参数、结晶系统和空间点阵。该结构信息能够用于计算粉末衍射图。ICDD与剑桥结晶数据中心建立了合作计划,即ICDD可以采用CSD中的数据资料来计算粉末衍射图。

2. XRD 用于固体制剂中各成分的鉴别

在固体药物中,除了主成分外,通常还含有一种或几种赋形剂。在这种粉末混合物中,每一种晶型成分都能被扫描出其独立的谱线,与混合物中的其他组分无关。因此,XRD在绝对选择性和高度准确性方面有其独特优势。Shell在应用XRD进行药物成分鉴别方面做了开拓性的工作,最近在设备和软件的进展又进一步加强了该项技术的作用^[13]。XRD可同时用于Excedrin药物中活性成分对乙酰氨基酚、阿司匹林、咖啡因的鉴别。该三种活性成分总重占该片剂质量的83%^[14]。XRD图谱在 $7\sim 37^\circ$ 衍射角处有众多的峰,制剂组分对乙酰氨基酚、阿司匹林、咖啡因有各自的XRD图谱[图3(a~c)]。对乙酰氨基酚在晶面间距为 6.48\AA 和 4.92\AA (2θ 为 13.65° 和 18.00°)时能够很容易的识别出有两个特征峰。在该两个 2θ 处,阿司匹林、咖啡因均没有峰出现。同样,阿司匹林在晶面间距为 11.54\AA 和 3.95\AA (2θ 为 7.65° 和 22.45°)时能够很容易的识别出有两个特征峰。咖啡因为在晶面间距为 7.55\AA (2θ 为 11.70°)时有一个明显的特征峰。在晶面间距为 3.39\AA 和 3.31\AA (2θ 为 26.25° 和 26.85°)时有两个特征峰。由于在这两个角

度处,对乙酰氨基酚和阿司匹林也出峰,故对于咖啡因做明确鉴别就不太可能了。更复杂的是,咖啡因仅占该片剂质量的8.9%。

为了鉴别咖啡因,从制剂混合物XRD图谱中减去对乙酰氨基酚、阿司匹林的图谱,图谱的差减在相关文献中有详述。对差减后的图谱[图4(a)]与咖啡因[图4(b)]进行比较,咖啡因为在 11.70° 、 26.25° 和 26.85° 衍射角处的特征峰能够很容易地辨别出来。然而,在 $18\sim 23^\circ$ 衍射角处为一无定形峰。由于在该片剂中有许多辅料,如微晶纤维素、羟丙甲基纤维素和羟丙基纤维素。微晶纤维素在 $18\sim 25^\circ$ 衍射角处有一较钝峰[图(c)]。羟丙甲基纤维素[图5(b)]和羟丙基纤维素[图5(a)]也有无定形峰,但角度与混合物XRD图谱不匹配[图59(d)]。因此,微晶纤维素可能是混合物XRD图谱中峰包的主要来源。据此,XRD图谱不仅可以同时鉴别出混合物中所有的活性成分,而且还可以提供赋形剂的信息。

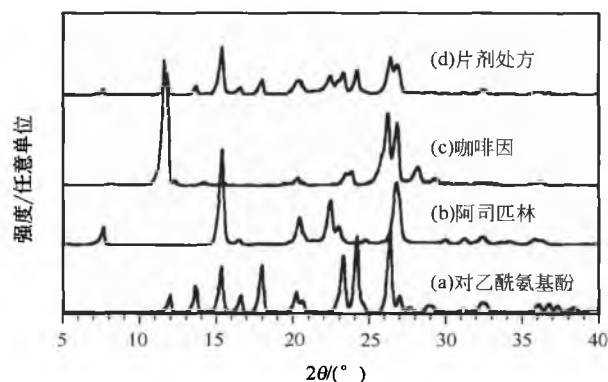


图3 (a) 对乙酰氨基酚X射线衍射图谱;(b) 阿司匹林X射线衍射图谱;(c) 咖啡因X射线衍射图谱;(d) 对乙酰氨基酚、阿司匹林与咖啡因混合物X射线衍射图谱^[14]

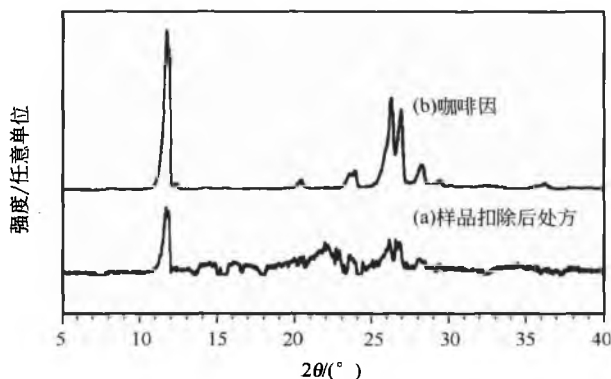


图4 (a) 从片剂混合物X射线衍射图谱比例差减对乙酰氨基酚和阿司匹林的衍射图谱后的图谱;(b) 咖啡因X射线衍射图谱^[14]

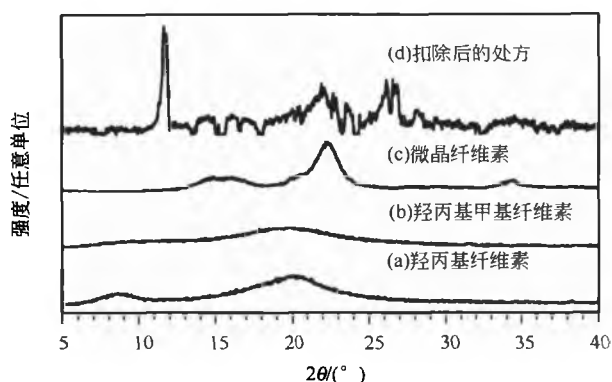


图5 (a) 羟丙基纤维素 X 射线衍射图谱; (b) 羟丙基甲基纤维素 X 射线衍射图谱; (c) 微晶纤维素 X 射线衍射图谱; (d) 从片剂混合物 X 射线衍射图谱比例减去对乙酰氨基酚和阿司匹林的衍射图谱后的图谱

作者通过研究甲氨二氮草酸盐来评价方法的灵敏度^[14]。甲氨二氮草酸盐有结晶性 [图 6(a)], 微晶纤维素有一无定形峰 [图 6(c)]。只要甲氨二氮草酸盐在混合物中所占比例大于或等于 0.10, 则鉴别就没有问题。当甲氨二氮草酸盐在混合物中的比例降至 0.05 时, 就不容易辨别出它的存在了 [图 6(b)]。采用图谱相减的技术, 用药物混合物 XRD 图谱减去微晶纤维素 XRD 图谱, 即可对甲氨二氮草酸盐进行鉴定 [图 6(d)]。

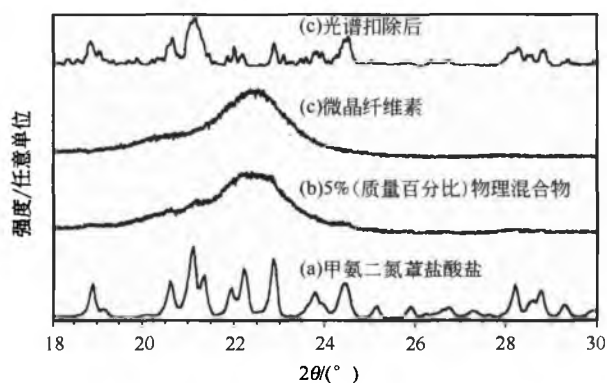


图6 (a) 甲氨二氮草酸盐 XRD 图谱; (b) 甲氨二氮草酸盐 (5wt%) 与微晶纤维素 (95wt%) 混合物 XRD 图谱; (c) 微晶纤维素 XRD 图谱; (d) 从混合物; (b) 中减去微晶纤维素 XRD 图谱后的图谱, 该图谱与另外三个 XRD 图谱满刻度不一致

3. 加工导致的相转移

对于药物制剂而言, 既包括主药成分又包括辅料, 在药物的生产与储藏过程中, 要经历种种物理转化, 包括晶型转化、结晶度转化、状态和水合程度的转化。XRD 是监控这些转化的有利手段。在大多数情况下, 可以不经过或很少样品前处理进行直接分析。因为 XRD 通常可以在

辅料存在下反映出活性成分的信息, 所以不需要从制剂中提取活性成分。该项技术可以同时定性鉴别定量测定组分中的多种活性成分。最后, XRD 可提供结晶度的定量信息。

当茶碱一水合物脱水时, 它形成亚稳的无水物, 而后又转化为稳定的无水物^[15]。该一水合物与两种无水物的 XRD 图谱完全不同, 由此就可以同时鉴别出样品中的三个成分 [图 7 (a)]。在 PVP 水溶液中茶碱无水物进行造粒。在潮湿环境下, 该无水物可以转化为一水合物。造粒干燥脱水的结果导致生成亚稳的无水物, 而后又转化为稳定的无水物。XRD 可同时监测该三相 [图 7 (b)]。

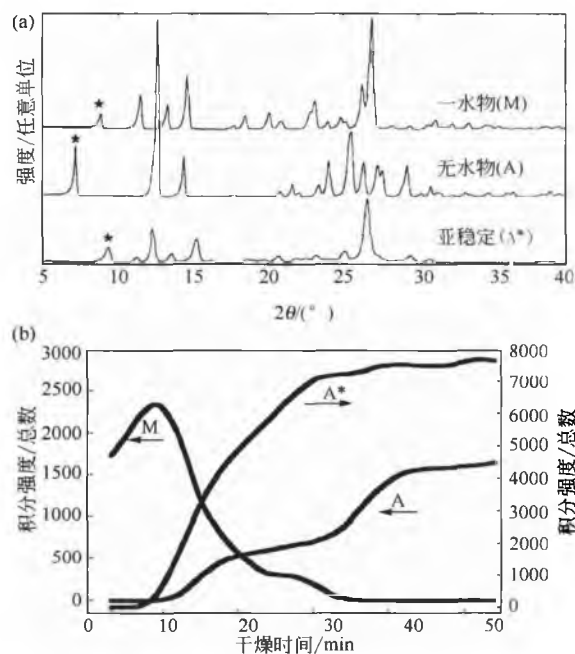


图7 (a) 茶碱各相的 XRD 图谱, M、A 和 A* 分别指茶碱一水物、稳定的无水茶碱、亚稳的无水茶碱 XRD 图谱; (b) 在茶碱颗粒干燥过程中的相转变。PVP 是黏剂。同时监测 M、A 和 A* 在各自的衍射角为 8.9°、9.4° 和 7.0° 处的峰强度对时间的函数

结晶度

固体分为晶体和非晶体两种。晶体以完全有序的晶格为特征, 非晶体 (无定形) 则以晶格无序为特征。除了这两个极端的晶格排列外, 还存在中间状态。结晶度可用于中间态固体的晶格化程度进行定量。

XRD 广泛用于药物结晶度的确定, Hermans 和 Weidinger^[16]提出了相应的程序, 基于以下三点设想: 首先, 应有可能从粉末衍射图中区分结晶强度 (I_c) 和无定形强度 (I_a), 通常是采用谱线积分强度 (曲线下面积) 胜过采用峰强度 (峰高); 第二, 试验测量的结晶强度与样品本身的结晶份额 (x_c) 之间有一比例关系; 最后, 试验测量无定



形强度与样品本身的无定形份额 (x_a) 之间的比例关系也是存在的。结晶度 (结晶百分比, x_c) 可通过以下公式来表达:

$$x_c = \frac{I_c 100}{I_c + \frac{q I_a}{p}} \quad (2)$$

式中: p 和 q 是比例常数。 I_a 和 I_c 通过改变样品结晶度而测得, 由测定的 I_a 值对 I_c 值作图可得直线, y 轴 x 轴上的数值截距分别提供 100% 晶型材料和 100% 无定形材料的强度。该方法被 Nakai 等^[17] 用来估计在不同磨细时间内乳糖的结晶程度 (图 8)。如果 q/p 已知, 通过试验测得的 I_c 和 I_a 可以计算出未知样品的结晶度。在不同时间里被磨细的微晶纤维素和地高辛的结晶度也能测定^[18,19]。当然, 这种方法也存在局限性^[6]。

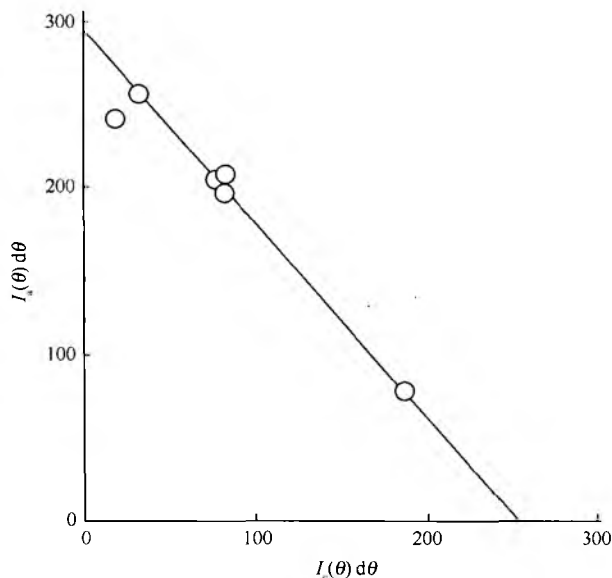


图 8 在不同时期研磨过的乳糖样品部分无定形强度 (I_a) 以及部分晶型强度 (I_c) 之间的关系^[17]

许多药物和辅料以无定形态存在。然而, 无定形化合物自身的不稳定性导致其部分转化为晶型物质。近年来, 若干方法用于少量无定形化合物中结晶物质的定量。以蔗糖为例, 采用 XRD 可以从无定形蔗糖中定量检测出结晶蔗糖的量^[9]。无定形蔗糖与结晶蔗糖的 XRD 图先前已经给出 (图 2)。在无定形蔗糖与结晶蔗糖标准混合物中, 结晶蔗糖以质量比 1%~5% 递增, 背景之和减去在衍射角为 12.7° (6.94 Å) 和 13.1° (6.73 Å) 的位置处的积分强度为蔗糖峰 (在图 2 中以星号表示), 该峰与结晶蔗糖的质量百分比有关 (图 9)。

结晶蔗糖的检测限或称定量限为 0.9%~1.8% (w/w)。对于 1% 以下的检测及定量有可能通过吸水作用与 FT-拉曼光谱来实现^[20,21]。

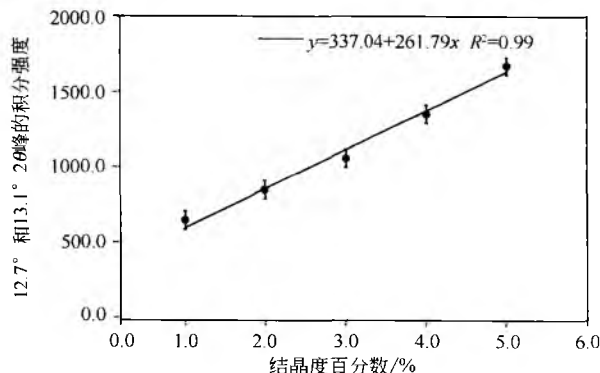


图 9 在无定形与晶型蔗糖混合物中晶型蔗糖所占的比重与衍射角 12.7° 和 13.1° 处峰积分强度的关系

相的定量 (定量分析)

1. 直接测定法 (不用内标)

Alexander 和 Klug 发展了粉末混合物定量分析的基础理论^[3]。虽然粉末混合物中可能含有多种成分, 但都被认为是由两种成分组成: 组分 1 (未知) 和其他组分之和 (被指定为介质)。未知成分 1 的峰强度 (I_{11}) 与其在混合物中的质量百分数 (x_1) 之间的关系可通过以下方程式来表达:

$$I_{11} = \frac{K x_1}{\rho_1 [\mu_1^* - \mu_M^*] + \mu_M^*} \quad (3)$$

式中: K 是一常数; ρ_1 是成分 1 的密度; μ_1^* 和 μ_M^* 分别表示样品中组分 1 和介质的质量衰减系数, 物质的该质量衰减系数是其组成元素的质量衰减系数的加权平均值。

我们首先考虑两个组分的混合物 $\mu_1^* \neq \mu_M^*$ 。某化合物中包含有水物及无水物, 首先要确定样品只含有 1 时的峰强度 $[(I_{11})_0]$, 然后将方程式 (3) 换以 $[(I_{11}) / (I_{11})_0]$ 的表达式, 来描述成分 1 的 XRD 峰的相对强度。

$$\frac{I_{11}}{(I_{11})_0} = \frac{x_1 \mu_1^*}{x_1 (\mu_1^* - \mu_M^*) + \mu_M^*} \quad (4)$$

由分析物及介质的化学成分可以计算出质量衰减系数^[2], 由此可以对混合物中的被测物计算, 求出相对强度 $[I_{11} / (I_{11})_0]$, 并作为质量分数的函数获得理论曲线。这样就没必要制备试验标准曲线了。该方法的另一好处是不需要内标。

该方法已用于测定卡马西平无水物和二水合物混合物中各成分的质量分数^[22]。根据无水物和二水合物的质量衰减系数, 可以计算强度比 $[I_{11} / (I_{11})_0]$ (图 10), 并作为混合物中无水物含量的函数, 与实验测得的 $[I_{11} / (I_{11})_0]$ 甚为相符。

一个存在两个组分混合物的简单系统, 当分析物与介质有相同的分子式即 $\mu_1^* = \mu_M^*$ 时公式 (4) 可简化为

$$\frac{I_{11}}{(I_{11})_0} = x_1 \quad (5)$$

因此,相对强度与分析物的质量分数呈线性关系。该方法可用于测定混合物中 α -卡马西平和 β -卡马西平无水物的质量分数^[23]。在研究 1,2-二羟-6-新戊基-2-氧尼古丁时,赵等^[24]用 XRD 在 I 型和 II 型混合物中定量了 I 型的含量。从 α 和 β 肌苷混合物中 α 肌苷组分的量在 0.4%也可被检测出来^[25]。

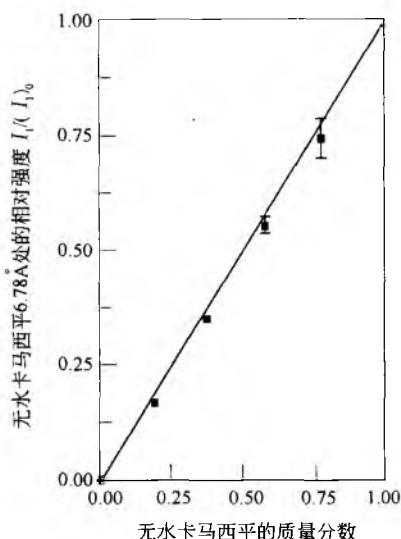


图 10 在卡马西平无水物与卡马西平二水合物组成的二元混合物中,卡马西平无水物的质量分数与 6.78Å 处的相对强度之间的关系。线为理论数值,点为实验结果

2. 内标方法

添加内标物质,令其质量分数在所有混合物中保持不变。该方法可以用于同时定量检测布洛芬的 S(+)-对映体

及外消旋体^[26]。

3. 挑选内标

XRD 定量方法成功的关键在于选择合适的内标物质。以下是选择内标物质的一些要求^[13]: ①该化合物应有较高的结晶对称性,所产生的衍射峰较强但较少;②所选分析物及内标物质用于定量的强峰应接近,但不能彼此重叠;③内标物质与活性成分体系的密度应比较接近,这样制样时比较易混合均匀;④在试验过程中,内标物质应有一定的化学稳定性。对于有机药物系统而言,有机内标物质是首选。由于有机化合物 XRD 的谱线较多,寻找到可以与内标物质完全分离的独特的用于分析的谱线也许是不可能的。因此无机化合物金刚砂(α - Al_2O_3)、硅、氟化锂和氧化锌作为内标是被经常选用的。有机化合物乌洛托品也符合部分内标要求,但在药物分析方面还没有广泛应用。

4. 粉末图形全分析

在药物领域,按照惯例根据分析特征峰的强度来定量分析。目前认为,基于完整粉末衍射图谱进行相定量更为精确^[26,27]。这些方法在最近几十年得到发展,其中 Rietveld 法被认为是最有效的,因为它是以结构参数为基础的。它对整图采用最小二乘法进行拟合,并扩展到晶体结构的拟合,以及测定晶体的大小和强度。

Rietveld 法还可对于复杂药物混合物的多种成分同时进行定量分析^[28]。采用氟化锂作为内标,对 α -卡马西平无水物、 β -卡马西平无水物和卡马西平二水合物组成的混合物进行定量分析(表 2)。当分析浓度较高(大于或等于 20%)时,方法较为精密,相对误差小于 5%。然而,当分析浓度较低(小于 5%)时,该方法就缺乏准确度^[28,29]。

表 2 Rietveld 分析得到的卡马西平混合物的组成和误差^[29]

卡马西平的实际组成/% (w/w)				卡马西平组成的测定结果/% (w/w)				$R^{1D} \text{ wp}/\%$
α	β	二水物	氟化锂	α	β	二水合物	氟化锂	
	80		20		79		21	20.0
	80		20		79		21	22.7
	80		20		80		20	20.7
	79.6	0.4	20		78	1	21	21.5
	79.2	0.8	20		80	1	19	21.4
	79.2	0.8	20		78	2	21	20.9
	79.2	0.8	20		78	2	21	21.4
0.4	79.6		20	<1	79		20	20.7
0.4	79.6		20	<1	79		21	21.3
0.4	79.6		20	<1	78		22	20.9
0.8	79.2		20	1	78		21	20.9

续表

卡马西平的实际组成/% (w/w)				卡马西平组成的测定结果/% (w/w)				R ¹⁾ wp/%
α	β	二水物	氟化锂	α	β	二水合物	氟化锂	
0.4	78.8	0.8	20	<1	77	1	21	21.3
0.8	78.8	0.4	20	<1	78	1	21	20.1
4	72	4	20	3	73	5	19	15.5
4	72	4	20	2	71	7	19	26.9
4	72	4	20	2	71	7	19	26.9
4	40	36	20	2	41	36	20	22.3

1) 误差。

非室温 XRD

按照惯例, XRD 操作的环境通常为室温。当样品需要控温程序时, 就需要采用可变温度的 XRD 以获取图谱。当然也可控制环境温度, 并将样品保持在所需的相对湿度中。最近商业上开发使用的仪器都极大地满足了在非室温条件下进行药物研究工作的需要, 使得高于或略低于环境温度的试验工作都可以展开。

1. 高温 XRD

在药物领域, 高温 XRD 使用广泛。本节先前讨论过一水茶碱在体内的相转化(图 7)。高温 XRD 曾用于研究一水茶碱的脱水过程(图 11), 表明茶碱一水合物脱水后会转化为亚稳的无水物, 再转化为稳定的无水物^[30]。茶碱多年来有广泛的应用, 其固态的性能曾是研究的重点。需要说明的是, 没有高温 XRD, 该化合物的亚稳相也识别不出来。

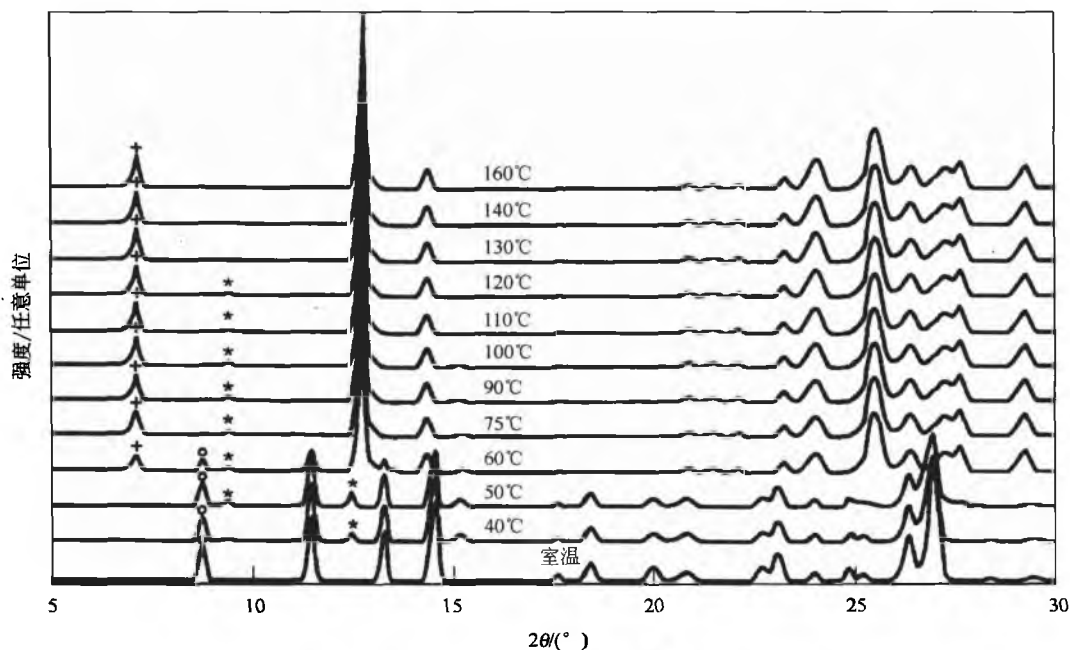


图 11 一水茶碱的高温 XRD 图谱, XRD 图谱在不同温度下获取。“*”, “+”和“o”分别为亚稳态的无水茶碱(图 7 中为 A*)、稳定的无水茶碱(图 7 中为 A)和一水茶碱(图 7 中为 M)^[29]

2. 固态反应动力学

药物中的固态反应普遍被分为化学分解和物理转化两类。在药物文献中, 药物的化学分解被关注的较多。实际上, 固体药物中的活性成分也经历着各种物理转化, 包括多晶型转化、结晶度的变化、溶剂化程度的改变等。这些转化

会影响药物的重要特性, 如溶解度、稳定性、粉末流动及片剂形态等, 并导致产品性能发生变化。要符合严格的药物标准不仅要控制药物的化学纯度及赋形剂, 而且还要控制制剂中药物的含量。另一方面, 几乎没有哪种化合物通过严格符合其药物标准在物理形态上得到有效控制。然而, 我们也逐渐认识到, 化合物的物理形态及制剂的物理转化能深刻影响



产品的性能。传统的分析技术如 HPLC, 仅用于监控化学分解反应, 但不能用于监控固态的物理转化。因为它不能识别化合物的不同固态。在固体药品的生产与储存过程中可同时存在化学分解与物理转化。因此需要有一种分析技术能同时监控两种类型的转化。XRD 就是这样一种分析技术。

热分析技术特别是差热扫描及热重分析, 已用于研究固相反应的动力学。但该技术也有一定的局限性, 不能明确识别出晶型, 也不能提供结晶程度的定量信息, 如果存在中间的固相, 也不容易识别出来。因此, 不适合应用这项技术辨识反应机理。当同时涉及两种或两种以上气体产物时, 单独的热分析不能进行动力学反应研究, 可与其他技术(如红外光谱、质谱学、气相色谱)联合应用。研究发现, 固相反应的发生机理非常复杂, 通常涉及多个中间体, 再由这些中间体通过多种路径最终得到同一产品。而热分析的热过程具有重叠性, 将反应步骤分离开来研究每一步的动力学是很困难的, 但 XRD 没有该局限性, 因此可作为热分析技术的极好补充。近来, 仪器方面的进步使得能够同时控制样品室的温度和水蒸气压力。

采用 XRD 研究了茶碱一水合物 ($C_7H_8N_4O_2 \cdot H_2O$) 和氨苄西林三水合物 ($C_{16}H_{19}N_3O_4S \cdot 3H_2O$) 的脱水动力学^[30]。茶碱一水合物脱水的结果是生成无水物晶型, 而氨苄西林三水合物脱水的结果是生成无定形无水物。对于茶碱, 同时定量分析一水物与无水物是可能的。在多个不同温度下使之发生反应, 能够检测出脱水反应的活化能。

能够检测到在固体时伪麻黄素的对映体转变成外消旋体化合物^[31]。对映体的粉末衍射图谱是一致的, 但外消旋体的粉末衍射图谱是不一致的。XRD 可以监控对映异构体的消失及后来外消旋体出现的程度。对映异构体消失的速率受扩散反应模式的制约。在动力学试验中, 由于可能有非结晶相的中间态形成, 故对映体及外消旋体的质量分数之和会从初始的 1 递减, 这可由背景在粉末衍射图谱中的稳定递增得到证实。

在室温环境下, 甜味剂阿司帕坦以半水化合物 ($C_{14}H_{18}N_2O_5 \cdot 0.5H_2O$, ASH) 的形式存在。加热时, 阿司帕坦脱水形成无水物 (ASA), 进一步加热又分解成为二酮哌嗪 (DKP)^[32]。XRD 粉末衍射图谱显示了 ASH、ASA 和 DKP 之间的显著差异 (图 12)。XRD 可同时定量检测第一步反应中 ASH 的消失与 ASA 的形成, 以及第二步反应中 ASA 的消失与 DKP 的形成。研究第一步反应的动力学, 采用 ASH 独特的峰衍射角为 15.9° 及 16.4° , ASA 独特的峰衍射角为 17.1° 。在第二步反应中, 采用 ASA 中衍射角为 10.2° 、 11.0° 和 11.8° 的峰强度的总和及 DKP 中衍射角为 13.0° 的峰。在第一步反应中, ASH 的脱水反应为一级动力学过程, ASA 的环化作用为晶核形成过程。图 13 和图 14 分别显示了在 118°C 与 180°C 时物质的脱水环化过程。因为结晶反应物的浓度与反应产物浓度同时显示, 所以每个时间点结晶相的质量平衡都是可以计算的。根据不同温度下的反应速率常数获得 Arrhenius 曲线, 从而计算出脱水物与环化物的活化能。

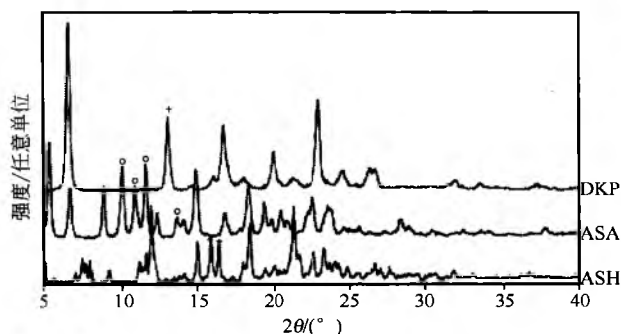


图 12 阿司帕坦半水化合物 (ASH), 阿司帕坦无水物 (ASA), 分解物二酮哌嗪 (DKP) 的 XRD。“★”、“○”和“+”分别表示各自的谱图^[33]

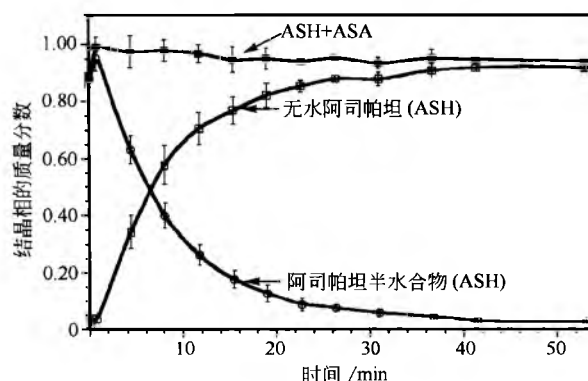


图 13 ASH 在 118°C 储存下 ASH 和 ASA 的质量分数对时间的曲线^[33], 该曲线仅为帮助目测判断趋势

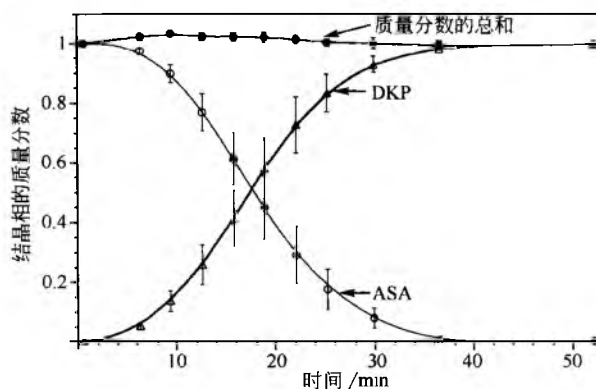


图 14 ASA 在 180°C 储存下 ASA 和 DKP 的质量分数对时间的曲线

3. 药物与赋形剂的相互作用

如果药物与辅料都是晶型的, 则采用 XRD 研究药物与辅料的相互作用是最优的。在固体混合物中, 每一种晶型都能产生相对独立的粉末衍射图谱, 因此混合物的粉末衍射图谱就是各粉末衍射图谱之和。如果药物与赋形剂相互作用的结果是产生了一种新的晶型, 那么反映在混合物的

粉末衍射图谱中就会出现新的峰。如果药物与赋形剂相互作用的结果是产生了无定形物,那么反映在混合物的粉末衍射图谱中就会出现钝的峰包。因此,不论产物的相如何,XRD 均可对相互作用做解答。

4. 低温 XRD

使用冷却附件可以保证在稍低于室温操作条件下也能获得 XRD 图谱。在药物应用领域,该项技术可用于显示冷冻溶液中溶质的结晶过程。按照惯例,DSC 是用来描述冷冻系统的最常用的技术。然而,如前所述,该项技术也有一些缺点:①它不能直接辨认晶状固体,而且很难给出明确的结晶度;②如果存在重叠热量事件,那么解释 DSC 曲线也很困难。对于水-甘氨酸-蔗糖三元系统,低温 XRD 是示差热分析的极好补充^[34]。

乙氧萘胺青霉素钠溶液被冷冻时^[35],溶质不结晶,然而退火可导致溶质结晶。利用 XRD 可描述出乙氧萘胺青霉素钠的量是退火时间的函数。XRD 也可用于表现缓冲溶液的特征,如当水溶液被冷冻时,磷酸氢二钠结晶析出,说明在结晶化物中也存在磷酸二氢钠。

原位冷冻干燥:X 射线粉末衍射仪的低温镜台被改进后,样品室能够抽真空。因此,整个冷冻干燥过程能够在 X 射线粉末衍射仪样品室中原位完成。该设备的优势在于能监控在冷冻干燥过程(第一步,冷却;第二步,干燥)中不同阶段固相的改变^[36]。如前所述,乙氧萘胺青霉素钠的冷冻水溶液退火的结果是产生乙氧萘胺青霉素钠水化物的结晶化物(水化物的化学计算值未知)。在最初的干燥过程中,一部分脱水物转化为乙氧萘胺青霉素钠半水化合物(图 15)。XRD 可以同时监控乙氧萘胺青霉素钠水化物的消失与乙氧萘胺青霉素钠半水化合物的形成(图 16)。根据 XRD 的监控,该反应需要 40min。该项技术也可用于显示甘露醇冷冻干燥过程中的相转变。

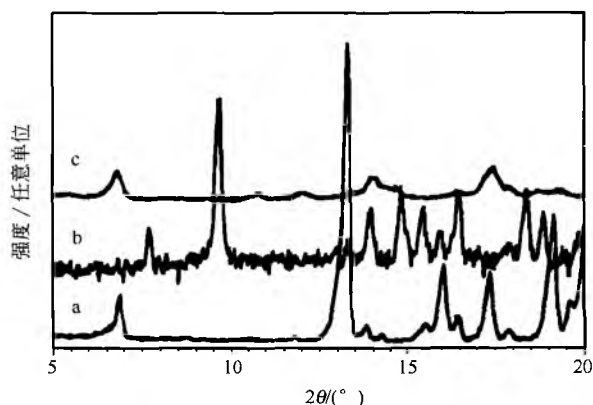


图 15 (a) 乙氧萘胺青霉素钠的 XRD 图谱(乙氧萘胺青霉素钠一水合物); (b) 冷冻后的乙氧萘胺青霉素钠溶液(40wt%) 经过 -4°C 退火 1h 后的 XRD 图谱; (c) 退火并经过冷冻干燥处理后的 XRD 图谱(部分为乙氧萘胺青霉素钠半水化合物)

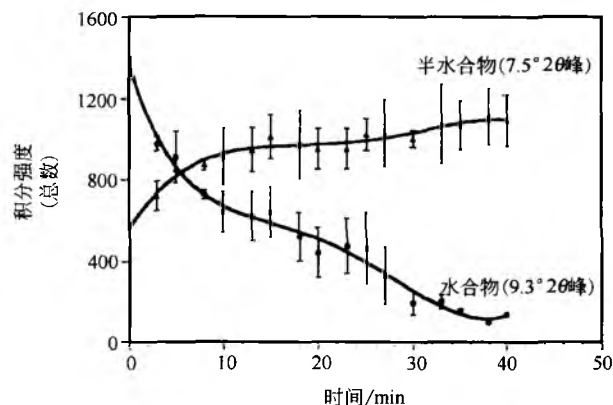


图 16 原位 XRD 实时监督乙氧萘胺青霉素钠在冷冻干燥过程中相转变的过程,同时量化乙氧萘胺青霉素钠一水合物的消失和乙氧萘胺青霉素钠半水化合物的形成。该曲线仅供用于观察趋势

5. 冷冻干燥制剂设计的意义

研究固相特征最主要是研究起始原料与冷冻干燥后的样品。利用低温 XRD,可以研究冷冻干燥过程中不同阶段的固相转变,如此不仅可以实现冷冻干燥循环过程的最优化,而且还有利于维持制剂产品物理与化学的稳定性。

XRD 中存在的有待解决的问题

大部分药物都是有机化合物。Jenkins 就 XRD 在有机化合物分析中存在的问题做了以下讨论^[37]:①有机化合物分子的晶胞通常较大,导致衍射峰位于低角度(高晶面间距)。随着晶面间距的递增,晶面间距数据的精确性递减,特别是晶面间距高于 8\AA 时。②晶胞的对称性较差,谱线显示较复杂。③由于有机化合物质量衰减系数较低,X 射线可以较深入的穿透入样品内部导致较大的光束透过误差。④有机化合物特别容易产生择优取向的问题。(择优取向在下节讨论)

1. 样品准备

制备样品有许多方法。大部分样品支架要求从顶部将粉末样品装填入样品室中,然而从侧边装填才是最好的装填方法^[1,38]。不幸的是,大部分商用样品支架无法做到。因此,为达到最佳效果,需特别制造样品室^[23]。因为有机化合物是由较小的原子组成的,会有相当的 X 射线穿透,结果可能会导致峰移位与加宽。部分文献对样品准备进行了详细描述^[4]。

当粉状样品非常少时,低背景支撑物的使用(也称为零背景)是可取的。该支撑物是沿晶体学方向切割石英后抛光而成的^[1],不仅背景非常低,而且提高了信噪比,极

少量的样品也可获得 XRD 图谱。

2. 误差原因

造成 XRD 误差的原因很多, 以下讨论其中两点。

2.1 择优取向

如果样品准备足够好, 可以获得可靠的和可重复的结果。样品最初被装入 X 射线装置内时, 结晶方位的分配并非随意的, 这种情况被称为择优取向。关于这点, Enkins 和 Snyder^[1] 用图 17 做了很好的说明。原子结合在一起, 形成样子独特的单个晶胞。如果单个晶胞成群, 其至于形成长的序列, 即得到结晶。如果没有长的序列, 即为无定形的(非结晶的)。一粉状样品由微晶组成, 微晶的特定状态(非任意)即称为择优取向^[1]。理想情况下, 各个微晶应呈无序取向。但对于粉末样品而言, 择优取向是普遍存在的情况^[2]。

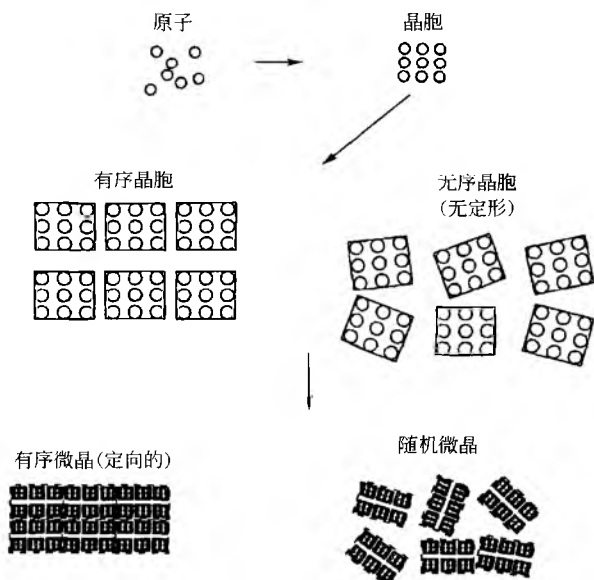


图 17 由固体组成的结构^[1]

磨碎样品以减小粒子大小能减少择优取向。然而, 研磨会引起晶格无序(结晶度的减少)和其他一些不需要的转变, 如多晶型的转变。而且, 当粒子非常小时, 能观察到由此引起的峰加宽。当颗粒小于 $10\,000\text{\AA}$ ($1\mu\text{m}$) 时, 所观察到的该效应可简单归因于只有有限的平面可衍射 X 射线(图 18)。颗粒(微晶)大小与 X 射线线宽的关系服从 Scherrer 方程^[1]。结晶度的损失以及颗粒大小的降低可导致谱线加宽, 认识这一事实是十分重要的。在药学文献倾向于将谱线的加宽归因于结晶度的损失。这一结论虽然通常是正确的, 但偶尔也是错误的。

2.2 线强度的测量

当测量强度时, 测量的是线强度(峰面积)而不是最

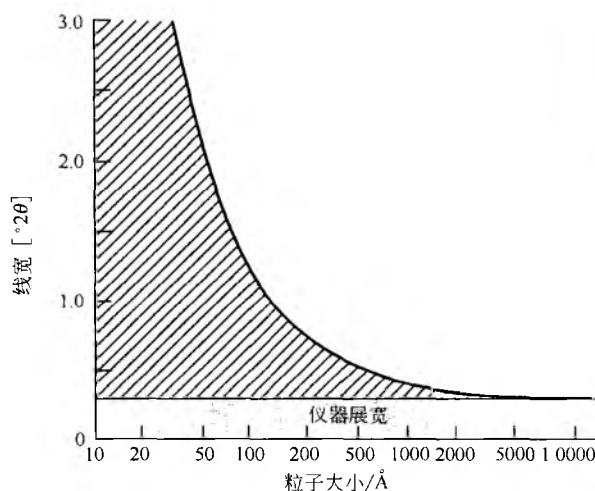


图 18 X 射线宽度与粒子直径的关系^[1]

大强度(峰高)。晶格的强度和颗粒大小能明显影响谱线的形状, 但它们对积分强度的影响通常是很小的^[2]。

3. 其他误差原因

XRD 的定量研究的其他错误来源在相关文献 [1~3, 6] 中有详细讨论。

参考文献

- Jenkins, R.; Snyder, R. L. Introduction to X-Ray Powder Diffractometry; Wiley: New York, NY, 1996.
- Cullity, B. D. Elements of X-Ray Diffraction, 2nd Ed.; Addison-Wesley: Reading, MA, 1978.
- Klug, H. P.; Alexander, L. E. X-Ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials, 2nd Ed.; Wiley: New York, NY, 1974.
- Buhrke, V. E.; Jenkins, R.; Smith, D. K. A Practical Guide for the Preparation of Specimens for X-Ray Fluorescence and X-Ray Diffraction Analysis; Wiley-VCH: New York, NY, 1998.
- The United States Pharmacopeia; 24th Rev. U. S. Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, 1999.
- Suryanarayanan, R. X Ray Powder Diffractometry. Physical Characterization of Pharmaceutical Solids; Brittain, H. G., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, NY, 1995.
- Rastogi, S.; Suryanarayanan, R. Characterization of Delivery Systems—X-Ray Powder Diffractometry. The Encyclopedia of Controlled Drug Delivery; Mathiowitz, E., Ed.; Wiley: New York, NY, 1999.
- Rastogi, S.; Zamansky, I.; Roy, S.; Tyle, P.; Suryanarayanan, R. Solid-State Phase Transitions of AG337, an Antitumor Agent. Pharm. Dev. Technol. 1999, 4 (4),

623—632.

9. Surana, R.; Suryanarayanan, R. Quantitation of Crystallinity in Substantially Amorphous Pharmaceuticals and Study of Crystallization Kinetics by X-Ray Powder Diffractometry. *Powder Diff.* 2000, 15 (1), 2—6.
10. Haleblan, J. K.; Koda, R. T.; Biles, J. A. Isolation and Characterization of Some Solid Phases of Fluprednisolone. *J. Pharm. Sci.* 1971, 60 (10), 1485—1488.
11. McClune, W. F., Ed. *Powder Diffraction File, Inorganic Phases, Organic and Organometallic Phases Search Manual*; International Centre for Diffraction Data: Newtown Square, PA, 1993.
12. *Powder Diffraction File; Set 43. Inorganic and Organic Databook*; McClune, W. F., Ed.; International Centre for Diffraction Data: Newtown Square, PA, 1993.
13. Shell, J. W. X-Ray and Crystallographic Applications in Pharmaceutical Research, II. *J. Pharm. Sci.* 1963, 52, 24—39.
14. Phadnis, N. V.; Cavatur, R. K.; Suryanarayanan, R. Identification of Drugs in Pharmaceutical Dosage Forms by X-Ray Powder Diffractometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997, 15 (7), 929—943.
15. Tank, J. Changes in the Solid-State of Theophylline Upon Aqueous Wet Granulation; M. S. Thesis Department of Pharmaceutics, University of Minnesota; Minneapolis, MN, 1997.
16. Hermans, P. H.; Weidinger, A. Quantitative X-Ray Investigation on the Crystallinity of Cellulose Fibres. A Background Analysis. *J. Appl. Phys.* 1948, 19, 491—506.
17. Nakai, Y.; Fukuoka, E.; Nakajima, S.; Morita, M. Physicochemical Properties of Crystalline Lactose. I. Estimation of the Degree of Crystallinity and the Disorder Parameter by an X-Ray Diffraction Method. *Chem. Pharm. Bull.* 1982, 30 (5), 1811—1818.
18. Nakai, Y.; Fukuoka, E.; Nakajima, S.; Hasegawa, J. Crystallinity and Physical Characteristics of Microcrystalline Cellulose. *Chem. Pharm. Bull.* 1977, 25 (1), 96—101.
19. Black, D. B.; Lovering, E. G. Estimation of the Degree of Crystallinity in Digoxin by X-Ray and Infrared Methods. *J. Pharm. Pharmacol.* 1977, 29 (11), 684—687.
20. Saleki-Gerhardt, A.; Ahlneck, C.; Zograf, G. Assessment of Disorder in Crystalline Solids. *Int. J. Pharm.* 1994, 101, 237—247.
21. Taylor, L. S.; Zograf, G. Quantitative Analysis of Crystallinity using FT-Raman Spectroscopy. *Pharm. Res.* 1998, 15, 755—761.
22. Suryanarayanan, R. Determination of the Relative Amounts of Anhydrous Carbamazepine and Carbamazepine Dihydrate in a Mixture by Powder X-Ray Diffractometry. *Pharm. Res.* 1989, 6 (12), 1017—1024.
23. Suryanarayanan, R. Determination of the Relative Amounts of α -Carbamazepine and β -Carbamazepine in a Mixture by Powder X-Ray Diffractometry. *Powder Diff.* 1990, 5 (3), 155—159.
24. Chao, R. S.; Vail, K. C. Polymorphism of 1, 2-Dihydro-6-Neopentyl-2-Oxonicotinic Acid: Characterization, Interconversion, and Quantitation. *Pharm. Res.* 1987, 4 (5), 429—432.
25. Doff, D. H.; Brownen, F. L.; Corrigan, O. I. Determination of α -Impurities in the β -Polymorph of Inosine using Infrared Spectroscopy and X-Ray Powder Diffraction. *Analyst (London)* 1986, 111 (2), 179—182.
26. Phadnis, N. V.; Suryanarayanan, R. Simultaneous Quantification of an Enantiomer and the Racemic Compound of Ibuprofen by X-Ray Powder Diffractometry. *Pharm. Res.* 1997, 14 (9), 1176—1180.
27. Anwar, J. Analysis of Time-Resolved Powder Diffraction Data using a Pattern-Decomposition Method with Restraints. *J. Appl. Crystallogr.* 1993, 26 (3), 413—421.
28. Rietveld, H. M. Profile Refinement Method for Nuclear and Magnetic Structures. *J. Appl. Crystallogr.* 1969, 2, 65—71.
29. Iyengar, S. S.; Phadnis, N. V.; Suryanarayanan, R. Quantitative Analyses of Complex Pharmaceutical Mixtures by the Rietveld Method. *Powder Diff.* in press.
30. Phadnis, N. V.; Suryanarayanan, R. Polymorphism in Anhydrous Theophylline—Implications for the Dissolution Rate of Theophylline Tablets. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86 (11), 1256—1263.
31. Shefter, E.; Fung, H.-L.; Mok, O. Dehydration of Crystalline Theophylline Monohydrate and Ampicillin Trihydrate. *J. Pharm. Sci.* 1973, 62 (5), 791—794.
32. Duddu, S. P.; Khin-Khin, A.; Grant, D. J. W.; Suryanarayanan, R. A Novel X-Ray Powder Diffractometric Method for Studying the Reaction between Pseudoephedrine Enantiomers. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86 (3), 340—345.
33. Rastogi, S.; Zakrzewski, M.; Suryanarayanan, R. Investigation of Solid-State Reactions using Variable Temperature X-Ray Powder Diffractometry. I. Aspartame Hemihydrate. *Pharm. Res.* (2001), 18 (3), 267—273.
34. Shalaev, E. Y.; Malakhov, D. V.; Kanev, A. N.; Kosyakov, V. I.; Tuzikov, F. V.; Varaksin, N. A.; Vavilin, V. I. Study of the Phase Diagram Water Fraction of the System Water-Glycine-Sucrose by DTA and X-Ray Diffraction Methods. *Thermochim. Acta* 1992, 196 (1), 213—220.

35. Cavatur, R. K.; Suryanarayanan, R. Characterization of Frozen Aqueous Solutions by Low Temperature X-Ray Powder Diffractometry. *Pharm. Res.* 1998, 15 (2), 194—199.
36. Cavatur, R. K.; Suryanarayanan, R. Characterization of Phase Transitions during Freeze-Drying by in Situ X-Ray Powder Diffractometry. *Pharm. Dev. Technol.* 1998, 3 (4), 579—586.
37. Jenkins, R. New Directions in the X-Ray Diffraction Analysis of Organic Materials. *Adv. X-Ray Anal.* 1992, 35, 653—660.
38. McMurdie, H. F.; Morris, M. C.; Evans, E. H.; Paretzkin, B.; Wong-Ng, W.; Hubbard, C. R. Methods of Producing Standard X-Ray Diffraction Powder Patterns. *Powder Diffr.* 1986, 1 (1), 40—43.

(朱 娟 陈桂良 译)



Y

压片的模具

Annette Bauer-Brandl

The University of Tromsø, Tromsø, Norway

引言

高速压片机的引入极大地提高了生产率,可以 24 小时连续生产,这对压片机和压片材料的可压性以及模具(冲头和冲模装置)尺寸的精度和耐磨性都提出了更高的要求。此外,在很多高速压片情况下,物料对设备的黏附已成为长期生产过程中必须解决的一个问题。在优化压片材料的同时,提高对模具的要求,以减少物料的黏附变得比以前更为重要。

在设备的使用过程中,必须特别关注操作和模具的维护。及时的机械维护不仅可以延长其使用寿命,而且可以从模具本身磨损的痕迹中发现生产过程中可能发生的不同事故,尤其是在压力较高,润滑不充分的情况下导致过度摩擦、阻塞压轮、冲头偏离或损坏。磨损的冲头不仅影响片剂的质量(片重差异加大、表面光洁度降低等),还会引发严重的设备问题(粉末黏附到润滑油中导致压片机本身的过度磨损)。由于设备的磨损进一步会导致黏冲问题,使生产不能正常进行。下冲长度的偏差直接导致成批片剂的质量差异加大;整个模具的长度变化也会导致压力变化,进而影响到片剂的溶出性质。

另外,压片模具的设计有望克服通过改变物料或压制方法而无法解决的共同性问题,比如设备的润滑问题通常取决于模具的大小和形状。

背景

下文将只讨论实例及其原理。提及或省略详细而精确的制造或模拟过程,不能构成任何有价值的判断。广泛推荐的读物是关于模具的技术和实际问题的“压片详细说明手册”^[1],并包含了压片的各个方面,包括压片材料的开发、压缩周期的优化和“药片模具”^[2]中的加工操作。

模具的一般术语

一套模具由上冲、下冲和冲模组成。上冲较短,下冲较长,因为下冲要在冲模中上下穿越较长的距离,完成填充、压制和推出的过程,而整个压片过程要从下面运行至冲模圈上口。

单冲压片机(往复压片机)的冲头固定在上下移动的支架上,在多数情况下要使用螺丝固定。每一台设备都有其本身的冲头和冲模支架设计,模具也是如此。因此很少使用单独的术语,只能笼统地讲,但大体上有关旋转式压

片机的术语也能适用。

旋转式压片机只有冲模固定在冲模台上,而冲头垂直移动,没有固定的位置。冲头在旋转架孔中来回滑动,由引导冲头头部的凸轮驱动。停留时间,即片剂处于完全压力下的时间,取决于机器运行经过冲头头部平坦部分的直径的大小。

相互作用部分,如冲头与冲模和冲杆与转动架导槽的间隙,取决于模具尺寸的公差范围(由于实际制造原因,相对于理论尺寸的误差)。冲模壁和冲头末端的间隙影响压片过程和片剂的力学性能。当压制粉末时,需要排除空气,并且压缩成型的片剂在冲模孔中向上移动时,间隙影响冲模壁的摩擦力。

旋转式压片机的一套冲头装置中,下冲总长度或工作长度的偏差直接影响到一批片剂的质量差异;小于 $\pm 0.1\text{mm}$ 的绝对误差可以导致小片剂 2% 的片重差异。此外,下冲和上冲长度的同时变化影响了压力的变化,因而影响了片剂的尺寸、抗张强度和溶出行为。对于上、下冲同时都短时,超量填充不一定会产生压力增加的信号^[3]。

单冲压片机的模具和压制模拟器

目前,单冲压片机一般只用于药物的研究和开发,很少用于药物生产。使用的研究模具是一种叫做“压制模拟器”的专用仪器化的液压压片机,允许在线测量压片过程的压力和位移。在许多情况下,压制模拟器设计能安装标准的单冲模具,并且每种类型的机器有特定的单冲模具,如 Korsch EK0 (<http://www.korsch.de>) 和 Kilian SP300 (<http://ourworld.compuserve.com/homepages/Kilian>)。模具的尺寸及其公差取决于压片机及模具厂商。

具有两节构造的冲头,可更换冲头的末端,这对于单冲压片机非常普遍,因为通常单冲模具不易磨损,并且相比于旋转压片机的模具可以较容易地对齐。对于上下两节的模具,为了避免在模圈中过度的摩擦,下冲末端没有固定紧,允许有些松动。为了提高生产力,由同一个支架上的多个冲头末端组成了多重模具。该模具已普遍用于小规模生产的单冲压片机,尤其以多节模具的形式,可以单独替换有裂缝的冲头末端。

旋转压片机的模具

图 1 解释了旋转压片机冲头和冲模的一般术语。冲头由冲帽、冲颈、冲体和冲杆组成。冲体的直径和总长度取决于机器转动架的尺寸。工作长度(即总长减去冲头末端

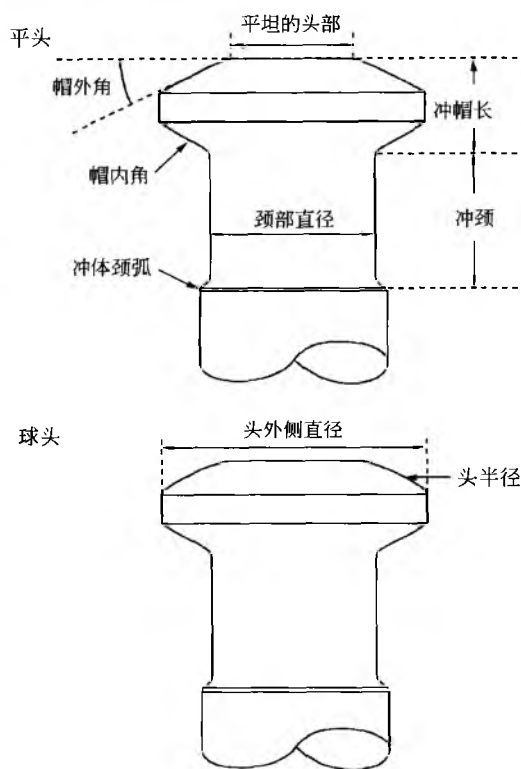


图3 冲头头部的术语

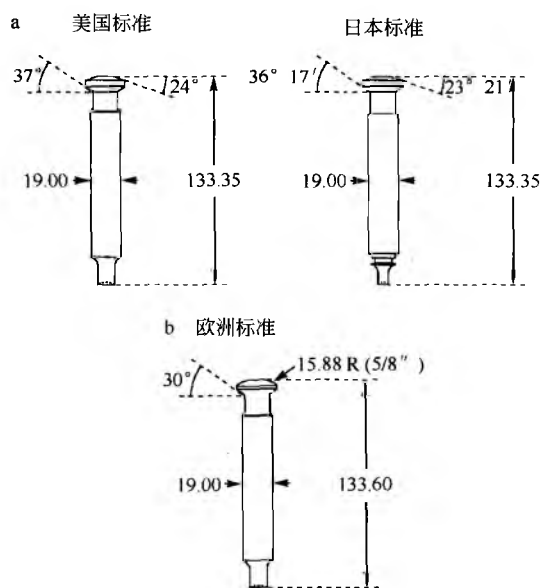
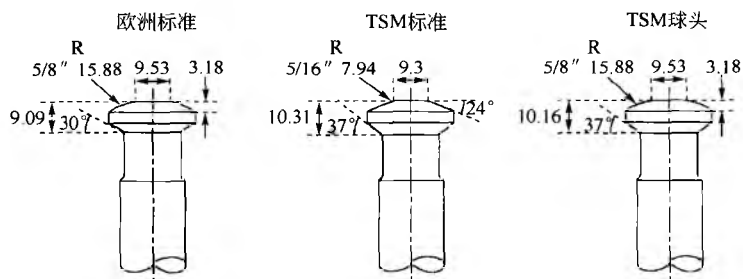


图4 根据总长度和头部形状划分的B-模具亚类
(a) 美国标准和日本标准; (b) 欧洲标准 (圆头)

(a) B-模具头部



(b) D-模具头部

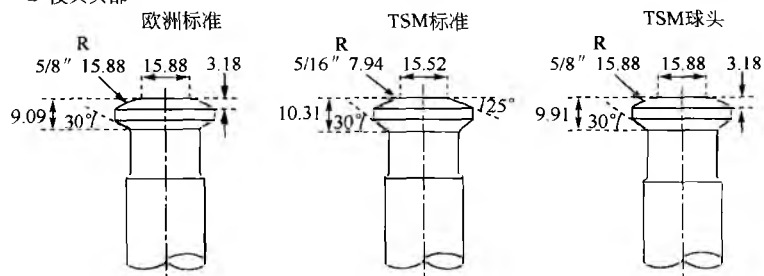


图5 标准模具的头部侧面图。(a) 欧洲亚类、美国标准和日本标准的B-模具头部; (b) 欧洲亚类、美国标准和日本标准的D-模具头部

D-模具还有另一种头部形状叫做 Fette EU1 441 (<http://www.fette.de>), 其特点是没有颈部和具有较大的头部直径 (38.00mm), 允许增加保留时间 (见“特殊模具”)。

B-模具进一步划分的亚类叫做 B2-类型 (Stokes, <http://www.stokesdti.com>), 具有相同的冲体直径, 但下冲的总长较小 (图 6)。B2 用于某些较老的压片机, 已不再生产。B-类型还有另一种变体, 其冲模的外径较小 (图 7)。冲模直径决定片剂最大直径和多重模具的模孔最多数量。较大的冲模张力较大, 虽然压力不直接作用于冲模, 只有侧向张力。图 8 (a) 解释了标准冲模的术语。冲模高度 (深度) 要确保与冲模台面一致。冲模外径标示的大小和制造公差, 应能够与转盘上的模孔紧密配合, 避免横向运动, 同时也要便于冲模凹槽螺钉固紧。冲模上的保护半径或保护侧翼可以预防对冲模锁定螺钉的损坏或冲模上的毛口及锐利边缘对转动架中冲模的损伤。制作的冲模孔应尽量接近其标示大小, 因为冲模孔大小决定片剂的大小, 而不是冲头。孔斜面可引导上冲进入冲模。

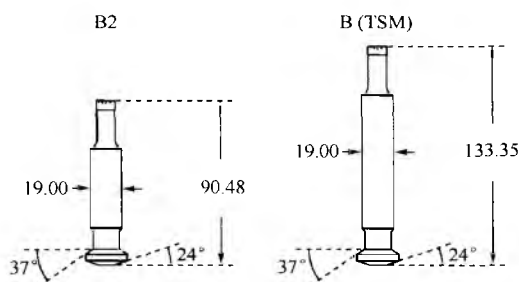


图 6 B-模具亚类: B2 模具与标准 B 的比较

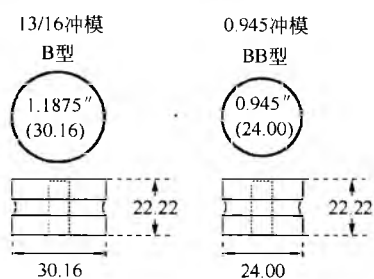


图 7 B-模具亚类: BB 模具冲模直径同标准 B 的比较

冲模壁和冲头间的任何间隙影响压片行为, 因为施加压力时陷入的空气会从空隙中逸出。图 9 介绍了术语。表 1 概括了冲头和冲模的制造公差以及它们之间的空隙。

如图 8 (b) 描述的冲模孔逐渐变细成圆锥开口, 与间隙相同的模具具有同样的效果。锥形冲模要比标准冲模贵得多。模孔的两端可以采用同样的锥形, 允许冲模的倒置。锥形冲模不仅让空气逃逸, 而且通过渐增的直径排出片剂使压力逐渐释放, 从而防止顶裂和增加片剂的抗张强度。此外, 使用锥形冲模允许机器速度的更高。

为了防止任意的转动, 所有不同于圆形的其他形状的异型冲头和多末端冲头在冲体上要有导向键。图 10 解释了键的相关术语。键有两种形式: 半圆键和平键 (又称欧洲键), 可根据冲体中的键槽形状区分。在多数情况下, 键可用螺丝固定在键槽上。冲体上键的垂直位置和键本身的长度由转动架的尺寸决定, 并考虑到冲头与转动架引导键缺口之间的间隙。有关片剂形状与键之间的最佳角度由压片机的旋转方向和冲头末端排出点刮片装置的设计决定, 因此不是标准化的。应避免片剂的拐角撞击刮片装置; 应用平滑面撞击刮片装置以保证片剂不破碎排出。冲头键的普通构造及其长度可以在片剂说明技术手册中找到^[1]。

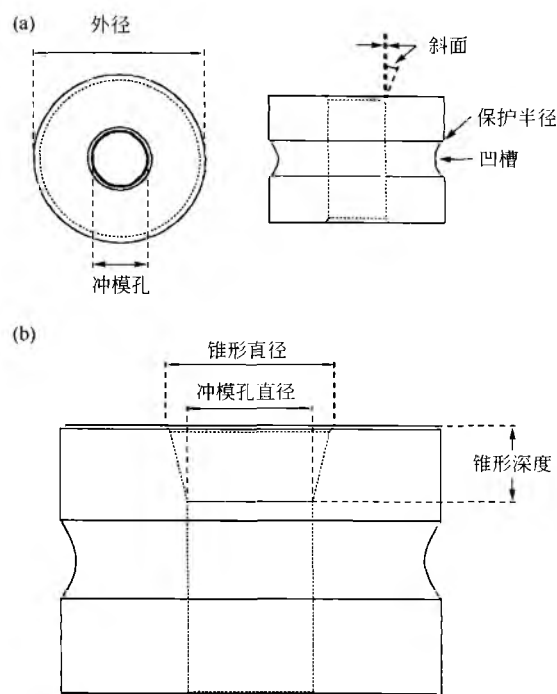


图 8 冲模术语: (a) 标准冲模; (b) 锥形冲模

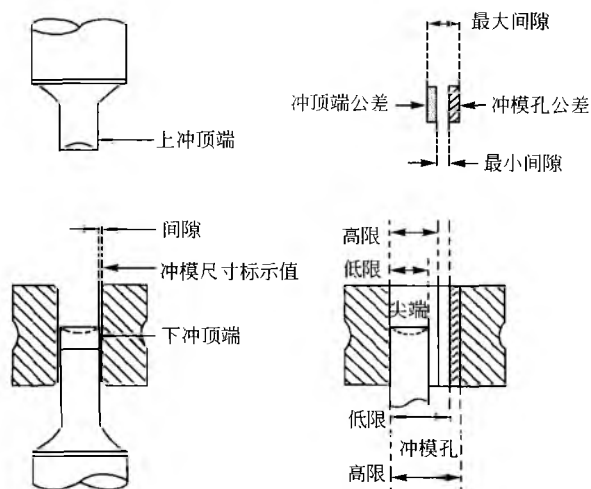


图 9 公差和冲头和冲模间隙的术语

表 1 标准化模具的公差和间隙

a) B-和D-型的
圆形模具的公差

上冲	总长度	$\pm 50\mu\text{m}$
	工作长度	$\pm 10\mu\text{m}$
	头部直径	$+0\sim 100\mu\text{m}$
下冲	总长度	$\pm 50\mu\text{m}$
	工作长度	$\pm 10\mu\text{m}$
	头部直径	$+0\sim 100\mu\text{m}$
冲模	高度	$\pm 10\mu\text{m}$
	直径	$+0\sim 10\mu\text{m}$
	同心性	$\pm 25\mu\text{m}$

b) 圆形和异型模
具的公差和间隙

	圆形模具/ μm	异型模具/ μm
标示冲模孔大小	$+10\sim 0$	$+20\sim 0$
上冲末端公差-40		-60
下冲末端公差	-20	-40
上冲/冲模最小间隙	40	40
上冲/冲模最大间隙	60	80
下冲/冲模最小间隙	20	20
下冲/冲模最大间隙	40	60

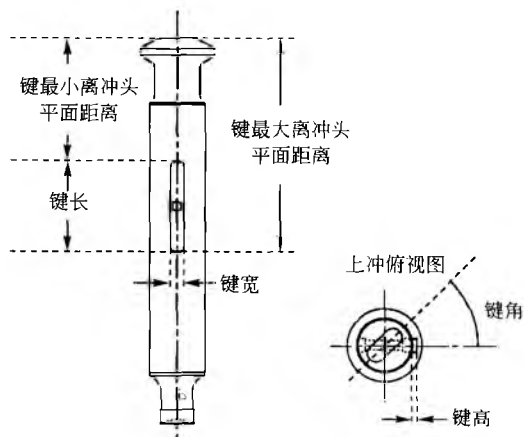


图 10 冲头上的键：术语

通常，在圆形上冲和下冲上的冲体凹槽是沿着冲头长径的垂直方向开槽，在生产过程中，它们必须旋转从而刮掉冲头导槽中可能的原料沉积。

安装在冲头的冲体至冲杆侧面的多种类型的防尘盖和密封垫可用于防止机油从上冲滴下污染片剂，也可安装欧洲标准的硅橡胶冲头套作为专用密封圈（例如，来自 Holland, <http://www.iholland.co.uk>）。

专门模具

考虑到压制过程中更长的保留时间和更高的压片压力，许多压片机有它们自己的模具规格，比如先前提到的 Fette EU1 441 和冲模形状亚型的 Kilian 25/32，即凹槽（无颈）和狭槽。在模具鉴别图表中，这些和标准类型汇总在一起（图 11）。大多数压片机都能获得由制造商提供的符合标准尺寸模具的转动架。

具有末端可替换的两节式构造的冲头也可用于旋转压片机，但需要特别小心和富有经验的人员来操作，因为这些冲头可能很难装配和对齐；为了提高生产力，它们大多数与多重模具一起使用，从而降低了额外的成本。

Korsch (www.korsch.de) 有一个专门的设备用于解决黏冲问题，在压片之前和之后使整个冲头旋转以防黏冲。围绕这些冲头的颈部有一个钝齿轮。

从 Manesty (<http://www.manesty.com>) 可获得一个特殊的冲头的冲帽可旋转的模具，能够使成型模具的冲头旋转以增加冲头和凸轮的使用寿命。

IMA (<http://www.ima.it>) 开发了一种特殊设计的高速机器。利用增加的离心力，在中心填料。这个设计需要两片式制造的特殊模具。这意味着只有冲头末端需要改变，这种特殊机器节省了时间^[5]。

仪器化的冲头和冲模能够在线测量冲头压力和相对位移或加速度、电阻和声音释放以及冲模壁压力，这些特殊的模具只能在研究中使用；它们将在单独的章节讨论。

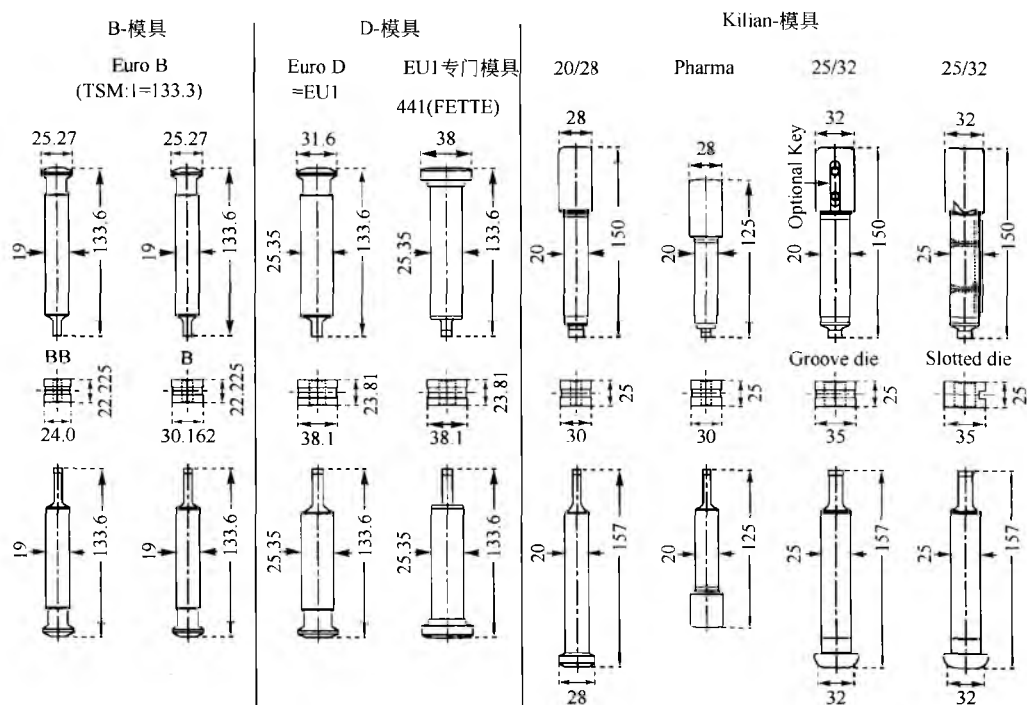


图 11 著名模具的形状和尺寸比较

冲头末端

首先，必须大致区分圆形和异型片剂。图 12 介绍了圆形平顶和凸顶片剂的形状及其各自冲头末端的形态的术语。

图 13 解释了冲头末端的边缘设计及其在压片过程中所承受的的压力和随之产生的偏斜力。不可能维持一个无限的锐利边缘，因为它会迅速磨损；为了增加压力公差，图中也显示如何通过抛光冲头末端引入平面。平面与杯连接处可设计成锐角转角、标准曲率（半径）或混合半径。

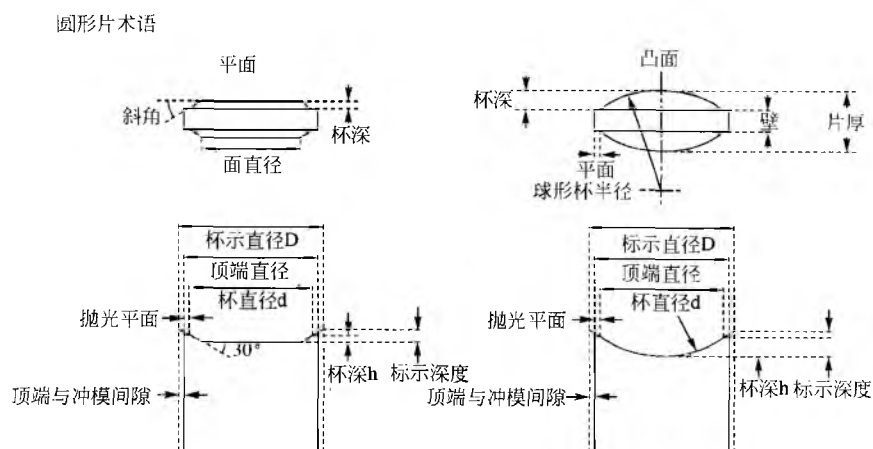
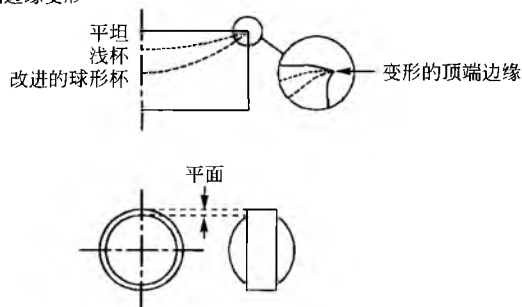


图 12 平面和凸面圆形片剂的术语

锐顶端边缘变形



顶端在压力下倾斜

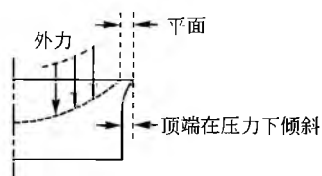


图 13 冲头顶端边缘负载量以内的磨损和变形，对片剂形状和尖端倾斜的影响

在图 14 中可以找到圆形片剂的剖面术语。类似地，图 15 解释了异型片剂的术语，图 16 描述了著名例子的形状和剖面。

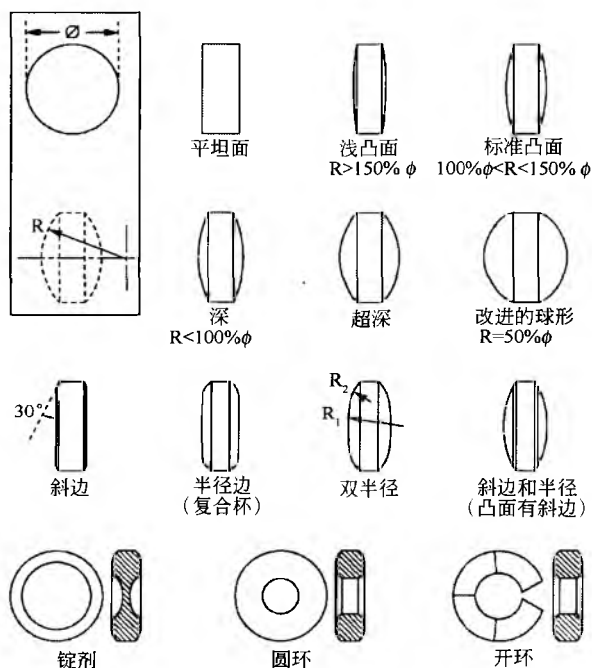


图 14 圆形片剂的剖面图 (开环片剂: 来自 Notter, A. R. German patent DE4342146 C1, 1993 年 12 月 10 日)

异型片术语

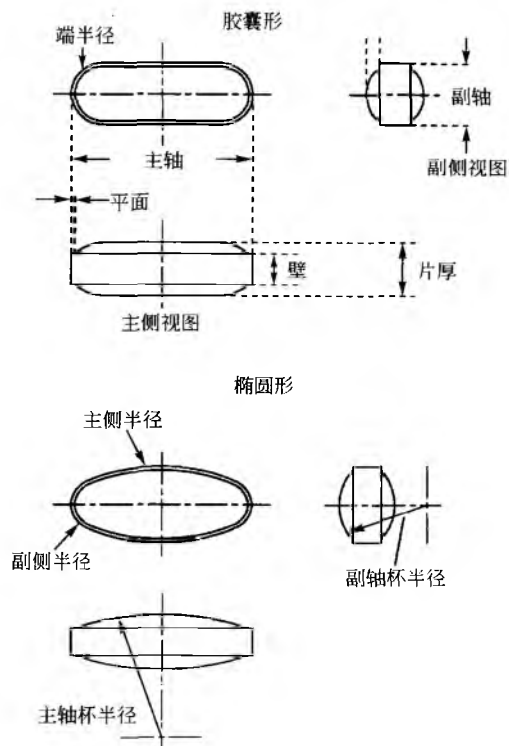


图 15 异形片剂术语: 胶囊形和椭圆形片剂的剖面

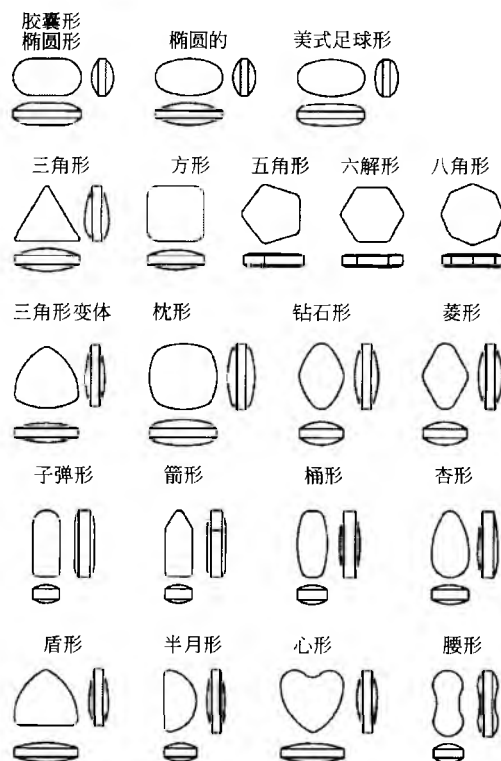


图 16 著名片剂形状的例子 (经 Pitter Pharmatechnik 公司的许可)

为了避免黏冲, 建议避免尖角。与平面及杯连接的特性相比, 通过修圆冲头表面的斜边, 改变斜面和平面的连线处的尖锐的角, 从而减少了材料黏附到尖锐边缘的可能性, 并已建议用于减少黏冲问题^[6]。

分割线大部分是二分或四分线, 而雕刻通常由字母或图形组成, 便于鉴别片剂。片剂上的刻字可以是阳刻或阴刻, 冲头上的雕刻刚好相反, 两者的字体和图形成镜像(图 17)。在许多情况下, 分割线和雕刻会引发黏冲问题。为了定量片剂黏附到冲头表面的脱离力, 开发了一种专门的仪器^[7]用于优化雕刻和表面的角度^[8]。由于黏冲大多发生在雕刻的侧面, 原因是压片过程中在此处会产生剪切力, 上述引用的作者一般建议雕刻笔画的最深处至表面为小角度(在 $45^{\circ} \sim 75^{\circ}$ 之间——关于如何定义开角的问题, 参见图 18)。这与 Sabir、Evans 和 Jain^[9]的发现相反, 他们建议采用 90° 角, 但其研究缺乏结论, 因为不像标准模具, 陡角模具是镀铬的。Waimer 等使用圆锥进行测量^[7,8], 可以假定每单位面积由更多的侧面组成的雕刻, 侧面越多越需要注意。经验上建议避免锐角, 如在字母“A”中所出现的, 可使用圆弧; 模具生产商采用特殊的一套圆形字体(图 18)。为了保证包衣材料的润湿, 薄膜包衣上的雕刻外表必须是平坦的。片剂表面可供雕刻的最大面积取决于冲头端面杯的深度。

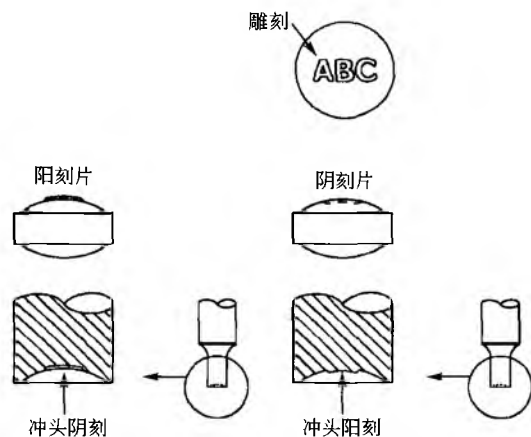


图 17 片剂和冲头的阳刻和阴刻

最近几年, 对分割线的要求增加。所有的分割线必须保证片剂分成相等的部分, 用于装饰的线不再合法。保证一个可重现的裂缝很重要, 因为分割线下方的粉末承受最高压缩力和最大压紧力, 因而在许多种情况下机械性能最强。因此, 分割线不应该太深, 药片表面的刻痕用于保证一个规定的分裂线。刻痕要求冲头表面上的凸刻, 因此必须避免冲头旋转。图 19 介绍了一些典型的标准二分线类型。为了在硬垫上使用一个手指按压片剂方便地分割, 需要优化异形片剂表面二分线的形状、角度和深度(如图 19, 较低的线; 图 20 和图 21)。

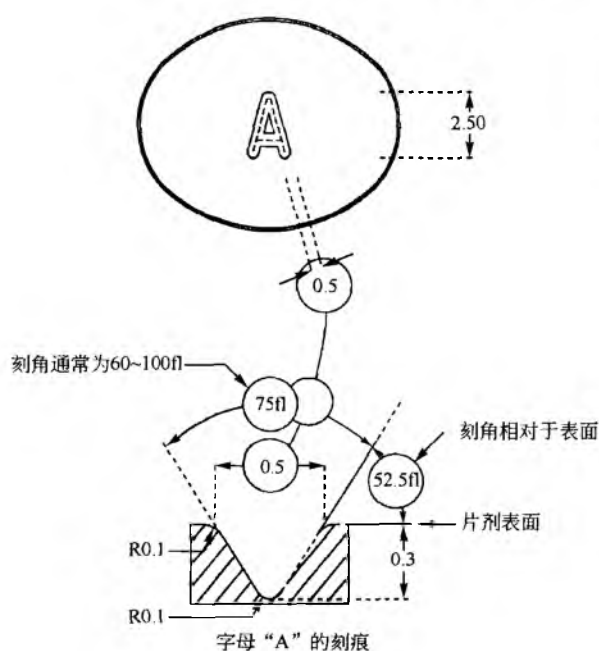


图 18 雕刻的术语, 以字母“A”为例
(经 Pitter Pharmatechnik 公司的许可)

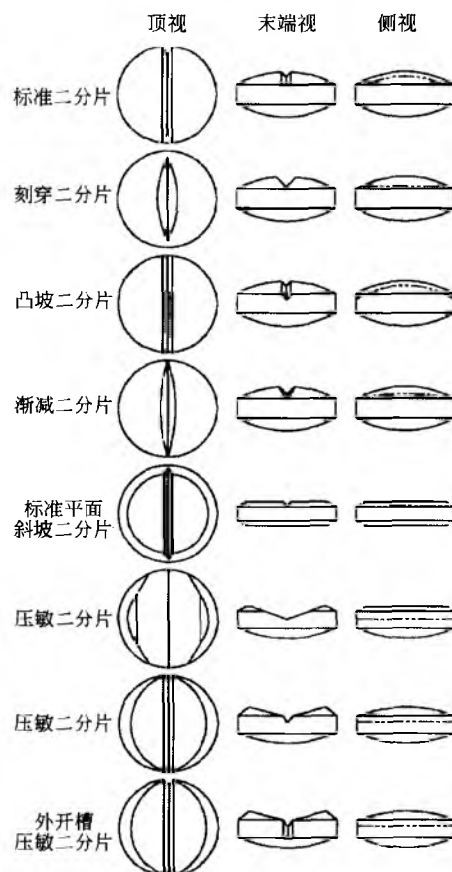


图 19 常用二分片的形状 (经 Pitter Pharmatechnik 公司许可)

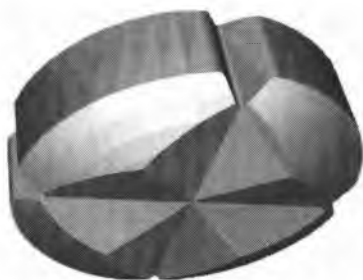


图 20 压力敏感四分片的例子
(经 Pitter Pharmatechnik 公司许可)



图 21 将压力敏感片剂分成相等分的方法

除了那些药用的片剂外，一些较大的片剂对重现性的要求较低。即能够在片剂表面压出一个凹槽，这类片剂可作为表面活性剂混合物，用于洗盘子。冲头可设计成合成材料制成的可互换圆锥^[10]。

多重模具在同一个转动架上有多个冲头顶端；为了增加生产力，相应的冲模上要有多个模孔。其缺点之一是需要更加小心地使用这些精细的模具，但多重模对于提高小片剂的生产效率无疑是有用的。生产 2mm 直径的迷你片剂作为微丸的替代品，具有更好的填充胶囊的重现性和更好的比表面积的重现性，这对于包衣过程和后来的活性药物的释放重现性较为重要。多重冲头顶端往往生产成多片式冲头设计的多重模具。获得 19 个顶端包拢成的冲头，可用于迷你片剂的标准化生产。55 个顶端包拢成的多重模具在实验研究中被证明有效 (<http://www.ritter-pharmatechnik.de>)。图 22 描绘了微小模具的构造。



图 22 多重模具的构造左图：迷你片，2mm 直径，右图：6mm 片的三重模具（经 Pitter Pharmatechnik 公司的许可）

材料、生产、抛光和压力公差

1. 材料和生产

钢铁主要分为碳钢和合金钢，是由国家和国际标准定义的，如美国试验材料标准和德国国家工业标准。碳钢含有少于 1.65% 锰、0.6% 硅、0.6% 铜，硼和还原剂及碳作为主要的添加剂以增加硬度。锰也能增加硬度，尤其能够通过回火变硬，出现在所有的钢铁中。硅用作还原剂。合金钢超过这些限度或者含有额外的元素，如铬、钒、钨、钼、镍和钴等。高镍含量增加了对药物盐中释放出来的盐酸引起的侵蚀的抵抗力^[11]。模具使用的特殊钢类型的组成、来源和热处理是模具生产厂家商业秘密的一部分。

高耐磨损性常常与一种钢铁类型的高硬度一致，而延展性和柔韧性低，反之亦然。非常硬的模具可能会破裂，易延展的材料可能会很快磨损。硬度和延展性不仅取决于钢铁的化学组成而且取决于热处理（回火）。冲头末端的二次回火程序由计算机控制，在真空熔炉内高温操作，软化材料和防止破裂。

如果使用相同的材料，通常冲头的使用时间要比冲模长，这是生产商使用不同质量钢材的原因。冲模孔的表面在使用过程中会变得光滑或粗糙。除了压片材料的组成和压紧力，推片力不取决于冲模壁的粗糙程度，而在很大程度上取决于冲模的金属类型^[12]。

对于特殊的压片任务，模具生产商将能提供最佳的模具特性。给其提供有疑问的压片材料的样品在这方面可能会有帮助。

表 2 给出了一些经常使用的钢铁品质的硬度特征。440C 有最高的铬含量（17%），增加了耐磨性。D2 和 D3 具有高铬含量（12%），并且富含碳（超过 1.5%）。铬和铁形成了稳定的碳化物，增加了硬度。S1 含有钨（2%），使热处理变得容易。有关钢铁的品质和国际标准的更多信息可以通过互联网从钢铁生产商或相关部门获得（例如，<http://www.sz-metal.si>）。

表 2 模具使用钢铁的硬度（Rockwell 硬度）

钢铁	S1 (BS1)	S7	BD2 (D2)	BD3 (D3)	440C 不锈钢
Rc 硬度	54~56	54~58	58~60	58~60	56~58

2. 抛光

在多数情况下，可以通过合适的模具抛光，避免冲头和冲模的黏着、黏冲和成膜。在某些情况下，冲头的持续使用会使表面变得光滑，而在另一些情况下，经过几千次压缩后，冲头末端会产生小刻痕，是否出现小刻痕取决于压缩材料的性质，如结晶乳糖^[13]。在表面的小刻痕和缺口上，冲头将会发生侵蚀。

模具表面抛光的公差也由生产商和国际标准规定，见



图 23. 抛光的表面粗糙度要小于 $1\mu\text{m}$ 峰谷高度, 尤其是冲头末端面和冲模壁需要抛光以达到更小的公差。

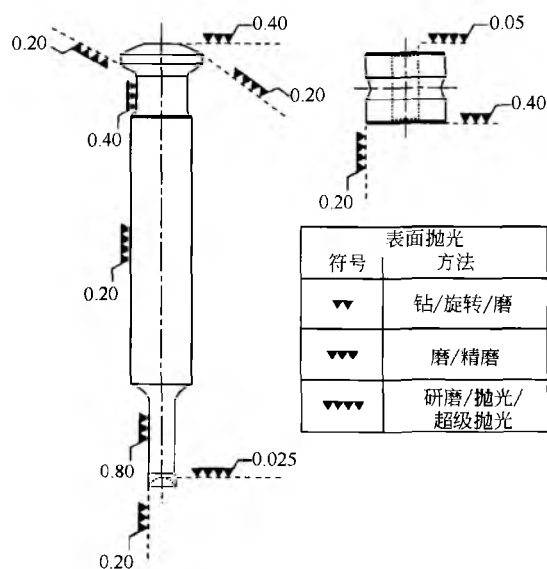


图 23 冲头的表面抛光; 峰-谷的公差 (单位: μm)

3. 冲头末端的涂层和镀层

减少推片力有助于避免层裂和顶裂, 并赋予片剂光亮的表面和更高的机械强度。内加润滑剂 (加入到压片材料中的润滑剂) 会起反作用, 这不仅因为将其混合是生产过程中的另一个关键步骤, 而且因为最有效的润滑剂是疏水的, 会使片剂变软, 增加片剂的崩解时间和溶出时间。尝试在每一次压片之前用液体或固体润滑剂涂布模具是相对复杂的, 因为要考虑到方法的可行性、重现性、灰尘的产生和 GMP 要求等。在多数情况下, 一个相对容易的方法是对冲头进行抛光, 通过冲头末端的特殊涂层或镀层减少摩擦从而减少推片力。另一个原因是涂层或镀层会减少片剂对冲头的黏附, 当然黏附不一定会随着推片力的减小而减少。在压制有腐蚀性化学药品时, 同样有必要增加冲头的耐腐蚀性能。对于所有涂层和镀层的关键要求是它们的耐磨损性, 同时还必须考虑涂层的厚度, 因为它会影响偏差和公差。由于这也是生产商和专门公司商业秘密的一部分, 关于这个主题只有很少的出版物。

硬铬电镀层的厚度约为 $30\mu\text{m}$, 它不应与空白铬镀层混淆, 空白铬镀层由数层其他金属和顶端很薄的一层铬组成, 并不适用于模具。硬铬镀层虽然表面看起来光亮和平滑, 实际上要比空白涂层多孔, 易碎, 在多数情况下不能充分耐磨。而且, 任何痕量的铬进入产品也是药用所不能接受的。并非在所有情况下, 它们都具有期望的抗黏冲效果^[14]。

结节状低密度铬是 FDA 批准的用于整个冲头及其所有面的涂层。

通过表面氮原子轰击铬能使铬以硝化铬的形式埋入表面 $1\mu\text{m}$ 深处。已证明这种处理方式对于黏冲问题有很好的

效果^[14], 使表面变得比较耐磨。钛也可以按相同的方式以硝化钛的形式应用。这种处理方式赋予模具青铜色的外观, 因为正如电子显微镜所看到的, 其表面比较粗糙。可以增加硬度, 提高耐磨性和耐腐蚀性, 但是对于摩擦的效果要小于使用 CrN 的情况。

有人介绍了能同时用于冲头和冲模的镍-铬-硼合金涂层^[15,16], 并与未经过处理的模具比较。令人吃惊的是, 涂层可能具有期望的效果, 或根本不具有效果, 或甚至增加了推片力。作者得出结论, 无论如何这些片剂在外观上具有优势。

碳化钛是目前可获得的最坚硬的表面处理材料。

已经证明聚四氟乙烯树脂的耐磨性不足以承受压片。

已证明 $0.1\sim 10\mu\text{m}$ 厚度的碳层掺入 $5\%\sim 30\%$ 的氢, 耐磨性极佳^[17], 能够预防片剂的黏冲。可使用 CVP (化学蒸发沉淀) 方法进行无定形碳涂层, 该法也能用于金属、合金、碳化物和硝化物的涂层。这通常能获得较低黏附性和较好耐磨性的涂层, 但是这个过程必需的高温 (1000°C) 会软化和扭曲钢铁。离子镀层是另一种确保低黏着性和减少冲头扭曲的方法。

4. 替代材料

内衬式冲模使用衬人物安装于金属的外壳, 由一种更坚硬的材料组成, 如碳化钨或陶瓷。内衬物用于压制磨蚀性或腐蚀性材料。

钢铁的外壳保护更坚硬更易碎的内衬物免于可能的故障, 如冲模锁定螺钉等。

5. 最大承受压力

压力承载能力取决于冲头的最小直径, 例如冲头末端用车床加工面的直径和杯深度。这可以根据模具钢铁的负载能力计算。表 3 给出了最大允许压力的指南。

6. 寿命

疲劳故障是累积性的, 因为任何过压都会施加微观的损害。它与每一个负载循环的最大压力有关: 压力减少 25% 延长可以寿命十倍。建议不要超过有限寿命的最大容许压力水平; 为了消除疲劳故障, 最好改变冲头末端杯的设计。

平均寿命受颗粒组成和润滑剂性质的影响最大, 处于 20 万到数百万次的压缩次数之间^[18]。

冲头报废的主要原因是头部和末端的损坏。末端边缘毛口、有凹痕的面、变形及变平的二分线或雕刻以及末端平面尺寸的磨损。冲模孔的磨损会终止冲模的寿命, 而碳化物嵌入冲模通常使冲模螺钉槽变形, 进而增大的间隙加速磨损, 导致冲头和冲模间粉末的挤出。转动架上上冲的偏差, 可能会加倍导致冲头末端的毛口。凸轮的设计和凸轮轮距的公差决定了冲头头部的磨损, 现代机器控制更小的公差可延长冲头的寿命。

表3 圆形模具允许的最大压力 (kN); 作为指南的估计值^[2]

直径		平面	有斜边的平面	雕刻 (取决于杯深度)	深雕刻和修饰球
mm	in.				
4	5/32	10	6	4~7	2
5	3/16	15	10	6~11	3
6	7/32	22	14	8~15	4
7	9/32	30	19	11~20	6
8	5/16	39	25	15~23	8
9	11/32	50	31	18~34	10
10	13/32	61	38	23~41	13
11	7/16	81	50	30~55	16
12	15/32	88	55	38~65	18
13	1/2	104	65	50~82	20
15	19/32	115	77	60~110	27
20	25/32	185	144	90~180	51
25	1	240	210	180~220	90

注: 10kN=1t。

成套冲头的维护

成套模具, 即上冲、下冲和冲模不应该互换。因此, 它们常常刻有数字标记, 冲头刻在颈部, 冲模刻在外壁。当模具安装到压片机时, 必须特别小心。安装说明通常附在各个压片机的手册里。总的来说, 仔细对齐是关键, 安装提示见参考文献 [19], 并询问模具制造商。专门的成套维护器材对于更换冲头非常有用, 并包含一套辅助工具, 可从压片机生产商和模具生产商处获得。

在每一次生产结束之后, 以及在运行中进行长期持续生产 (如每天) 的情况下, 应仔细清洁模具。除非使用特殊的清洗机械, 热肥皂水和软刷适用于彻底清洗; 如有必要, 数分钟的超声浴也很有用。必须注意不要刮伤表面! 当使用热水清洗时, 乙醇或异丙醇可以用来除去任何残留的油脂。为清洗卸下冲头和冲模需要花很多时间。一些压片机 (如来自 Fette 的 Korsch) 由能够互换的包括整个模具的转动架构成, 这样能够在完全自动的清洗机器中清洁转动架, 同时压片机的剩余部分在原位清洗。这将大大减少清场时间, 尤其当有两个单独的转动架可用时。

清洗后不应该用裸手指接触模具。为了预防腐蚀, 所用的模具通常用无酸油彻底地涂布。药用石蜡和凡士林可以替代昂贵的商业化产品。一些用户想要避免使用所有的润滑油, 因为油脂可能会引起黏冲的问题; 在这种情况下, 冲头很可能黏上硫酸镁的灰尘, 需要用乙醇清洗, 并储存在控制湿度的环境中。

模具表面粗糙和尺寸的变化是使用和磨损的结果。模

具表面应用放大镜频繁检查。及时抛光会延长模具的寿命。抛光可以按传统的方式手工完成, 在使用超精细抛光剂的车床、抛光池和抛光青铜刷。另外, 可以使用划算的“拖拉修整”机器 (例如, 来自 Otec, <http://www.otec.de>)。该机器拖拉和旋转冲头和冲模通过由特殊的石蜡包衣的细小磨料组成的颗粒。这个过程大约需要花 1h, 具体时间取决于颗粒的磨蚀性。这个过程不会使模具变得完美, 只会使模具的表面粗糙度减小, 每当模具变得迟钝和脱色时可以使用。此外, 冲头圆柱也需要抛光, 这有助于预防冲头的移动。

冲头头部、冲头末端和冲模孔的磨损类型可能会指示压片过程中的特定问题。测量冲头和冲模的尺寸是一项需要经常执行的任务, 测量工作可以在计算机辅助下进行。需要检查的尺寸包括总长、杯深度、工作长度、直径、末端直径和冲模孔尺寸。请使用测微计。

为了估计转动架和上冲的间隙和转动架导向装置的磨损, 很容易测量上冲末端的偏差, 这种偏差约为 100 μ m。如果超过 0.3mm, 冲头及导向装置已经磨损。

磨损是不可避免的, 它会慢慢改变模具的尺寸。因此, 推荐定期周转成套的备用模具以补偿已经磨损的模具。

在模具储存于橱柜中时, 应将各个冲头装置清楚地排列, 并保护它们免受撞击、灰尘和湿度的影响。冲头平放或悬挂有多种方式, 橱柜可由不同的材料制成, 并且具有不同程度的气密性。

有一个特殊的模具系统, 它是由单独的冲头和冲模浅盘组成的, 能够组合所需的足够多的浅盘, 具有容易检查和清洁的开放设计^[20] (可从 Holland 购得, <http://www.iholland.co.uk>)。

GMP 的要求和片剂产品连接成套模具的必要性导致特殊软件 (如来自 Natoli 的 TM II, <http://natoli.com/> 和来自 Holland 的 Vali-Scan) 辅助的“模具管理器”的引进。该软件收集了每个单独编码的成套冲头和冲模的信息, 以提供模具寿命的记录。软件可以安装在移动的滚轮中, 在安装到机器之前将检查每个单独模具的编码。

结论

许多常见的压片问题 (如黏冲、顶裂和腐蚀等) 不能通过优化压片材料的性质和压缩循环解决, 但可以通过改变模具的设计解决。设计上可以改变的有外形、材料和 (或) 各个模具的抛光等。虽然软件程序 (如来自 Natoli 的 Tablet-CAD) 可用于设计任何可能的冲头末端性质, 理论计算片剂的体积、表面积和其他有用的特性, 但不能保证能够在实践中压制成片剂。此外, 很难根据冲头的设计想象片剂本身的情况。出于这个原因, 可以购买用一种特殊的可塑性材料快速便宜地制成的模拟模型, 其商品名为 Elizatab (Elizabeth Carbide, <http://www.eliz.com>)。由于模具生产商从事有效的片剂设计已经有很多年了, 当出现有关模具或片剂设计的任何问题时, 通常建议咨询他们的建议。

参考文献

1. Tablet Specification Manual (TSM); American Pharmaceutical Association: Washington, 1995.
2. Ritschel, W.; Bauer-Brandl, A. Die Tablette, 2nd Ed.; Editio Cantor Verlag: Aulendorf, Germany, 2002.
3. Ling, W.C. Tooling as a Factor in Tablet Weight Variation. *J. Pharm. Sci.* 1973, 62 (12), 2007—2011.
4. Notter, M.; Notter, K. Tablettierwerkzeug, Insbesondere Tablettierstempel. European Patent 0 841 152 A2, October 24, 1997.
5. Fabbri, G.B. Tool-Holder for Tablet Making Machine. US Patent 5, 882, 696, March 16, 1999, I. M. A. Industria Macchine Automatiche.
6. Cargille, J.J. Tooling Face Configuration—Particularly Adapted for Forming Tablets (Cargille Curve). US Patent 5, 164, 206, November 17, 1992.
7. Waimer, F.; Krumme, M.; Danz, P.; Tenter, U.; Schmidt, P.C. A Novel Method for the Detection of Sticking of Tablets. *Pharm. Dev. Technol.* 1999, 4 (3), 359—367.
8. Waimer, F.; Krumme, M.; Danz, P.; Tenter, U.; Schmidt, P.C. The Influence of Engravings on the Sticking of Tablets. Investigations with an Instrumented Upper Punch. *Pharm. Dev. Technol.* 1999, 4 (3), 369—375.
9. Sabir, A.; Evans, B.; Jain, S. Formulation and Process Optimization to Eliminate Picking from Market Image Tablets. *Int. J. Pharm.* 2001, 215 (1—2), 123—135.
10. Holderbaum, T. Tablettierstempel. German Patent DE 199 08 027 C1, February 2, 1999, Henkel KGaA.
11. Narurukar, A.N.; Purkaystha, A.R.; Sheen, P.C. Effects of Various Factors on the Corrosion and Rusting of Tooling Material Used for Tablet Manufacturing. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1985, 11 (8), 1487—1495.
12. Otz, M.; Thoma, H. Effects of the Metal Type and the Roughness of the Die Wall on the Expanded Work for Tablet Ejection. *Pharm. Dev. Technol.* 2000, 5 (1), 19—26.
13. Müller, B.W. Über Veränderungen der Pressflächen von Tablettierwerkzeugen. *Die Pharmazeutische Industrie* 1972, 34 (12), 972—976.
14. Schumann, S. The Effects of Chromium Nitride Ion Bombardment Treatment of Tablet Tooling on Tablet Adherence. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1992, 18 (19), 1037—1061.
15. Tsiftoglou, T.B.; Mendes, R.W. Effect of Boron Alloy Coating of Tableting Tools. *Pharm. Technol.* 1982, 6 (April), 30—32, 36—38.
16. Shah, K.B.; Augsburg, L.L.; Shangraw, R.F. Effect of Boron Alloy Coating of Tableting Tools. *Pharm. Technol.* 1982, 6 (April), 31—34, 41—42, 44, 49—50, 52, 54.
17. Hieke, A.; Grischke, M.; Brand, J. Vorrichtung zum Verpressen von Fließförmigen Feststoffen. German Patent DE 198 10 969 A1, March 13, 1998.
18. Swartz, C.J.; Ansel, J. Evaluation of Tableting Tool Life Records. *J. Pharm. Sci.* 1968, 57 (10), 1779—1782.
19. Ritschel, W.; Bauer-Brandl, A. Tablettierwerkzeuge. Die Tablette, 2nd Ed.; Editio Cantor Verlag: Aulendorf, Germany, 2002, 552—567.
20. Bal, G.W. Tooling Utility System. US Patent 6, 112, 896, September 5, 2000.

(梁福成 陈 昂 译)



压片工艺的机器原理、设计及故障处理

Michael J. Bogda

Barr Laboratories, Inc., Pomona, New York, U. S. A.

引言

口服固体剂型是药物输送最常用的方式，其中片剂和胶囊剂占主导地位。相对于胶囊剂来说，片剂是更为广泛接受和使用的药物输送方式，这有许多原因，例如生产成本低、结实可靠、易操作和包装、容易识别、生产效率高。在过去的几年，胶囊壳的可靠性问题导致了大多数的非处方药物从胶囊剂型转向片剂。

药物制成片剂已经有很多年了。在 20 世纪 50 年代期间，压制物理学取得了很大的进步^[1,2]。从那时起，人们对于制药工业中压制过程的理解取得了长足的进步，通过仪器化压片机、复杂数据收集系统的使用和数学模型的建立，开发了更稳定可靠的制剂处方^[3~5]。

在这段时期，研发工作中重要的一部分集中在旧压片设备压力和推片力测量信号的改进上。压片机设计的最新进展提高了机器设计的效率，从而优化压片效率、减小片重差异、提供更大灵活性、生产更多种的产品。然而，现代化的复杂仪器还是采用相同的操作概念，比如模圈填料、压片、药片弹出和刮去。因此，在用来评估压制材料性能的旧仪器上的研究对于探讨材料性能有着重要的作用。不管怎样，现代化的仪器在如下几个方面提供了更好的准确度和效率：

- 改进的物料输送系统；
- 改进的凸轮设计和材料；
- 多步压缩；
- 快速清洁和转换的分离设计；
- 改良的压力测量技术；
- 采用电子控制压力；
- 整合能提供在线片重、厚度和硬度测试的装置以反馈控制片重和压力；
- 高速单片分拣以剔除不合格的片剂。

因此，在这些改进了压片设计和进料系统的机器上可以进行优化的产品开发。

本章提供基本的信息以理解一般片剂的成型过程。介绍典型的压片机设计特性和压片机命名法。讨论压片机控制系统、过程自动化，压片设备中的工艺和产品故障排除。

片剂成型过程

压制片的质量取决于压片物料的填充特性和可压性。在压制过程中，限制片剂生产速率的是不均匀的物料填充特性。在还没有成功且可重复的填充（模圈加料）之前粉

末必须形成黏着的压制物，弹射出模圈时也应保持完整。因此，限制压片机生产能力的是不良的填充性和不良的可压性。

模圈填充特性取决于物料流动性，而物料流动性主要受到粒径和形态的影响。除此之外，物料间的摩擦力较高，引起粉末桥连和不均匀流动，对于模圈填充也是一个不利的影响因素。粒径分布不均匀也可能导致物料分层，引起均匀性问题。压片机采用容积填充法把物料装进模圈孔。大多数高速压片机配置了强制加料器，加料器使用了旋转桨来提高模圈加料的均匀性。对于某些物料，必须注意加料装置的动作不会引起过分混合或者物料的分层。

在合适的模圈加料之后，必须考虑物料是否能形成片剂。粉末的压片特性取决于物料的黏弹性。压片过程可以认为是一个用外力将两相系统压紧成型的过程^[6]。压制片的质量取决于药粉的可压和成型性、压制片减压、压制片从模具中弹出和从下冲刮去。图 1 即为压片过程的示意图。因为这些物料的黏弹性是时间依赖性的，所以压力（释放）速度都会影响片剂质量。

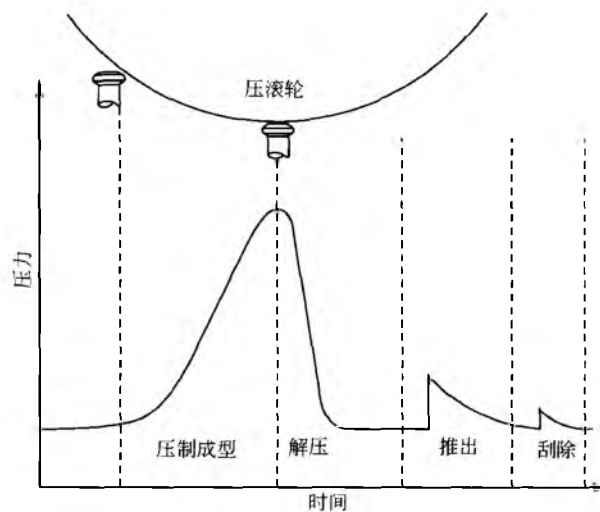


图 1 压片过程

1. 压制和成型

在压制过程中，物料的大部分体积由于气体相的消失而缩小^[6]。更大的力会引起微粒的变形和重排。在这点上，变形的三种主要机制如下：

(1) 弹性变形：压制片的一种自发可逆的变形，随着外力的移去，粉末复原到最初形态。在一定程度上，大多数粉末发生弹性变形。橡胶的加压就是弹性变形。



(2) 塑性变形：在超过物料的弹性极限（屈服点）后，变形可能变成塑性的，即微粒发生了黏滞流动。当微粒间的剪切强度小于抗张的或者折断强度时，黏滞流动即是占主导的机制。塑性变形是一种时间依赖性的过程。

(3) 脆性断裂：在超过物料的弹性极限（屈服点）后，当微粒间的剪切强度大于抗张的或者折断强度时，微粒发生脆性断裂。此时，较大的微粒被剪切并破裂成小颗粒。

压制过程包括了以上三种机制。考察的各种物料的性质决定了哪个机制是占主要的。既然一些变形特性是时间依赖性的，那么机器特性主要影响压片性能。这些特性决定了施力的速率、保留时间（即取决于冲头平面直径和正切速率的最大压力时间）和减压速率（见图1）。

通常当物料经历塑性变形时，随着机器运转速度增加，几乎没有时间松弛应力。在这种情形下，药片可能脱帽和分层。但是脱帽和分层可以通过减慢压制过程（降低机器运转速度）、降低施力速度（增大压轮直径）或者增加压制时间（多步压制）得到解决。

粉末的成型（或粘结）机制也影响到片剂的最终质量，而这个机制却受到粉末化学性质、接触点的表面积、污物（包括薄膜包衣物如硬脂酸镁）和微粒间距离的影响。主要的成型机制如下^[7~10]。

- 机械原理：随着微粒发生变形，微粒界面缠绕在一起形成机械结合；

- 分子间作用力原理：范德华力使分子在微粒界面新剪切的表面处结合在一起。通常认为微晶纤维素在压片时是通过氢键结合的^[11]；

- 液体表面膜理论：把微粒结合在一起的薄液膜产生在微粒表面。压制的能量使微粒界面产生融化或者溶液，随后发生凝固或者结晶，由此构成结合表面。由于施加压力，微粒可能融化或者溶解。压力释放后，发生凝固或者结晶。

压片时，分子间作用力原理和液体表面薄膜理论通常被认为是主要的结合机制。许多药物处方要求有一定量的残留水分以生产高质量片剂。水分在压片过程中的作用可以由液体表面薄膜理论来解释。

在片剂成型过程中，随着外力作用于粉末，塑性变形和脆性断裂产生新表面以致粉末直接接触。这些表面通过如上所列的很多机制结合在一起。塑性变形被认为产生数量最大的新表面。因为塑性变形是时间依赖性的，施加力的速度越高会导致新表面的生成越少，由此形成易脆的片剂。此外，因为片剂形成取决于新表面的形成，所以物料的高度浓缩或过分混合会形成弱的结合力，从而导致较脆片剂的形成。例如硬脂酸镁产生弱结合力和易受潮的表面，因此，硬脂酸镁的过分润滑或者过分混合导致形成脆的片剂。

碎裂（新表面的产生）在粘结和致密化的同时进行。高质量的片剂只有在粘结和致密化程度超过碎裂时才能形成。粘结和致密化产生的速度依赖于作用力施加的速度。

在压缩过程中，粉饼一般会经历升温过程^[12,13]，这个

升温过程依赖于摩擦效应，而摩擦又依次取决于特定的材料特性、润滑效率、压力大小和速率以及机器运转速度。典型的温度增加范围是在4~30℃之间^[14]。随着温度升高，应力松弛、塑性增强，片剂弹性减小和硬度增加^[15]。因此，在较高温度下压制物料，会增加延展性，得到强度更大的片剂。

人们认为在某些情况下预压是有益的，因为它有助于除去物料内部的空气^[16]和延长保压时间，从而增加应力松弛和塑性变形^[17]的程度和键合数，因此增加片剂强度。此外，通过增加压制时间，预压可以逐渐地施压外力和撤销外力。不过，最近的研究^[18]显示高强度的预压制（甚至超过主压制）可以改善压片特性使之超过常规压片。在常规压片中是主压制超过预压制。理论认为：这种结果是由于高的起始压力增加了片剂温度，从而增加延展性并使塑性变形更大。应用较低的二次压力，增加了微粒与微粒间的键合，而减少了微粒间键的断裂，从而使片剂的强度增加。

2. 解压

在模圈中的粉末压制成型后，成型的压紧物必须能够在解压和药片弹出时经受住遇到的应力^[19]。压力移开的速率（取决于压轮直径和机器运转速度）对片剂质量存在显著影响。在压制过程中发挥作用的变形，在解压过程中继续发挥作用。

在最大压力作用后，药片经历弹性回复。当药片被束缚在模圈中，弹性复原只发生在轴向方向。假如弹性复原的速率和强度很大，药片可能由于只在轴向方向上膨胀而在模圈中脱帽和分层。假如在解压过程中发生脆性断裂，这压紧物可能由于表面断裂而造成表面不平。那些没有脱帽和分层的药片就能够缓解塑性变形中不断形成的应力。因为塑性形变是时间依赖性的，应力松弛也是时间依赖性的。因此，药片破裂受到解压速率的影响（机器运转速度），这是因为挤压的粉末可能没有足够的时间来缓解解压过程中产生的内应力。含有足量微晶纤维素的处方由于其塑性变形性质一般能形成良好压紧物。但如果压片机运转速度和压片速率大大增加，这些处方就会呈现脱帽和分层倾向。

解压速率对压紧物成型（形成键合）的能力也有影响。基于液体表面膜理论，结晶或者固化速率对结合表面强度有影响。结晶速率受到压力（和压力移除时的速率）影响。高压速率会产生高的结晶速率。通常较低的结晶速率导致更强的结晶。因此，假如键合是通过这些机制发生，那么较低的压片机运转速度（较低的解压和结晶速率）应该产生强度更大的药片。

3. 弹射

在解压后，药片一直留在模圈中直到弹射出来为止。在这期间，残留的模圈壁力通过模圈壁作用在药片上。药片弹出经历三个阶段^[6]：

(1) 起初的弹射峰值作用力要求打破药片对模圈的黏

Y

附。该力是在弹射过程中遇到的最大的作用力，并且只存在非常短暂的一段时间。

(2) 该作用力要求把药片向上推出模圈壁，它一般低于弹射峰值作用力。然而，不充分的润滑或者损坏的模圈可能导致滑一黏行为，它使得药片持续在模圈壁表面黏附和打破黏附。这些情形一般导致压片失败。

(3) 随着药片从模圈中出来而作用力减小。

不充分的润滑一般导致高的弹射力，有可能使压片失败。弹射力小于 200N 是最佳的，尽管达到 400N 也正常。一般认为弹射力在 400N 和 800N 之间偏高。超过 800N 就会导致热的积累，可能导致机器损坏和生产失败。不充分的润滑也可能导致药片侧壁出现条纹、抓痕、黏冲。

在解压时经历显著弹性回复的药片可能在弹出模圈后呈现脱帽。在这种情形下，模圈中药片积累的非常大的应力只能在轴向方向上缓解。当药片自模圈时，它的顶部在径向和轴向同时膨胀，而还留在模圈中的部分仍然是被限制的。切应力沿着模圈边沿形成，从而导致压片失败。

4. 刮除

在弹射后药片被立刻刮除。图 2 显示了一个安装在旋转式压片机上的片剂刮除器。一般用于药片刮除的力是 2N 或者更小。6N 或者更高的刮除力导致药片黏附在下冲、损坏或者在更极端的情况下药片下部被剪断。通常，因刮除问题而导致的药片较低部分的剪断往往被误认为是脱帽。不管怎样，这种情况通过检查下冲和手动旋转压片机是很容易分辨出来的。

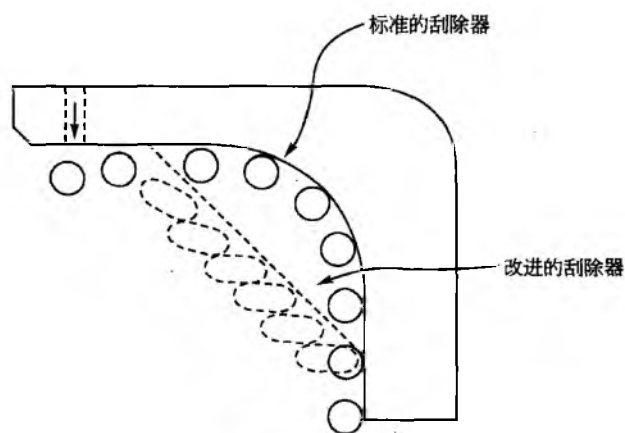


图2 药片刮除器

对于高速运转的压片机，由于药片堆在排出点而产生刮除问题。在许多情况下，经过特殊改进的药片刮除器通过尽可能快地将片剂排出模圈台而有利于片剂的成型（见图2）。

旋转式压片机设计

药片一般在旋转式压片机上生产（图3），由图可见，上下冲头分别位于上下转动架上。模圈嵌在模圈台上，通过模圈锁螺丝固定。上下转动架和模圈是精确对齐的。冲头

的运动通过凸轮轨道和压轮来控制。随着整个装置的旋转，上下冲头沿着凸轮轨道运动来实现模圈加料、压片、弹射和刮除。

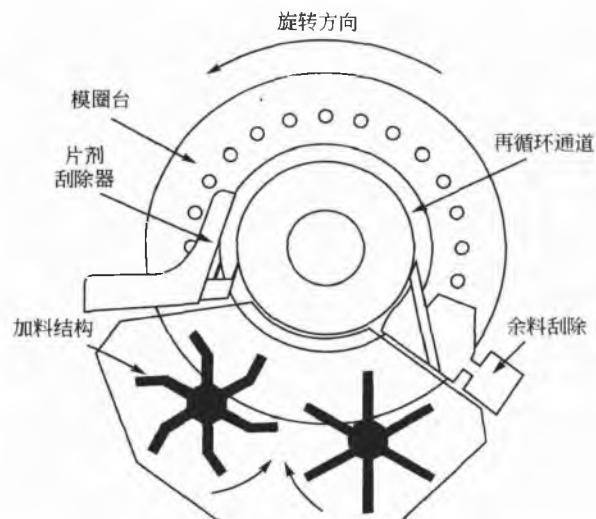


图3 旋转式压片机（俯视图）

1. 压片

压片可以分成两个不同但同样重要的阶段，包括模圈加料、片重的调整和如图4所示的片剂成型。随着模圈加料开始，下冲进入饲料器进口的过满凸轮，然后下冲面开始朝着模圈台面运动。下冲在饲料器下运行被过满凸轮推出。此时下冲几乎进入到饲料器的50%，模圈腔包含比需要更多的料。

往模圈腔加过量的物料之后，下冲经过片重调节单元被调节到一个不变的高度。这个高度即为填充的深度，也就是下冲面与模圈台面之间的距离。因为模圈充填是按容积进行的，片重调节单元中下冲的不变高度就可以提供恒定的物料体积。因此，填料深度就受到颗粒密度的影响。不同批次间颗粒密度的差异导致不同的填充深度，然而，同一批次的不同的颗粒密度导致填料深度的波动。

随着下冲由填料凸轮运动到片重调节凸轮，多余的物料被推回到饲料器，由余料刮除器刮离模圈台面，直接进入再循环通道。在许多现代化的压片机中，下冲在余料刮除器后面相对于模圈台最上面降低了大约2~4mm。这就减少了物料离开模圈台面，将物料被刮除后上冲进入模圈腔这个过程中不可控制的损失降到最低。在这些情况下，上冲直到进入模圈后才接触最上面的物料，这使物料损失和片重差异减小到最小。此外，减少物料离开模圈台面可以减少由于旋转模圈台产生离心力带来的物料损失。

模圈腔的过度填料对实现均一的片重和最优化的压片机运行条件是必需的。然而，有时候极端的过度填料可能导致其他问题，如研磨原料的过度损耗、易碎颗粒的粉末化、物料分层、润滑剂的过度混合等。因此，不同压片机运转条件的影响必须针对不同产品分别地进行评估。

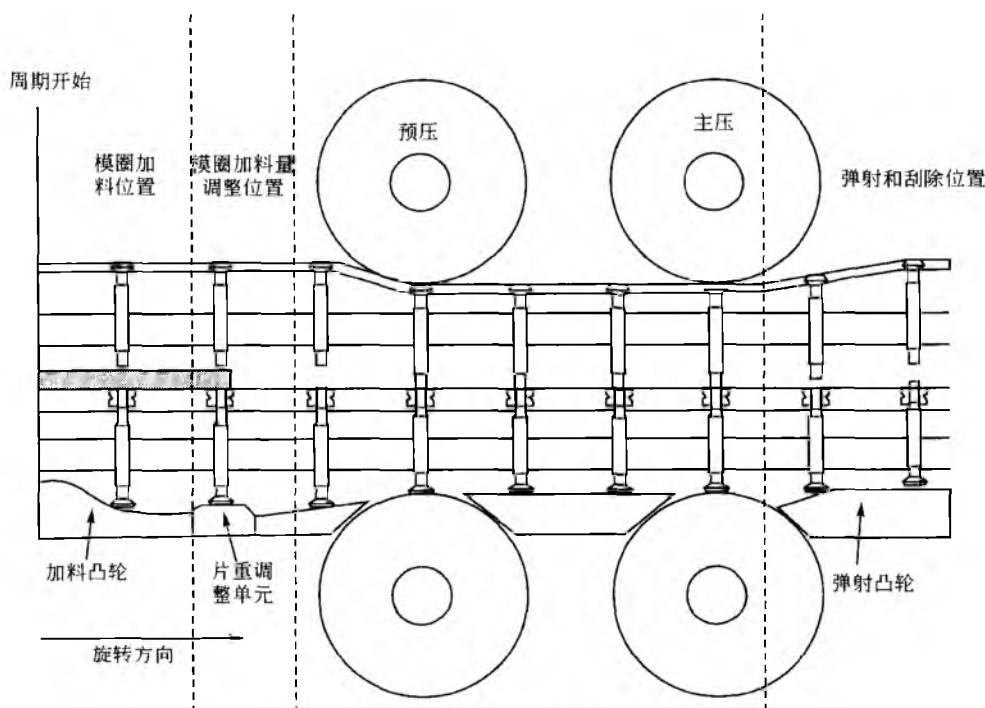


图4 旋转压片（压制顺序）

进入再循环通道的物料随后回到在片剂刮除器边的饲料器或者饲料器的内侧边缘。值得注意的是物料进口饲料器中的搅拌桨旋转的方向与辅助模圈加料和诱导物料流回饲料器的转动架的方向相反。

一般地，压片机最大运转速度取决于模圈填料特性，这是由于在压片机高速运转时片重差异过大造成的。然而，因为大多数药品的可压性呈现黏弹性，所以压片速度对物料的可压性也有较大的影响。因此，合适的压片能力常常是在片剂压制中所需要考虑的最主要的因素。

片剂成型的过程开始于余料刮除器后，上冲下降直接进入模圈腔。如前所述，当上冲进入时，如果物料低于模圈台面，对于减少不可控制的物料损失和片重差异是有益的。在上冲进入模圈之后，上下冲沿着凸轮轨道向预压轮的移动开始向彼此方向运动。在预压阶段，使用了最初（一般较低）的压力。传统上，压片机使用相对小的压轮（大约 4in, 100mm 直径滑轮）和 20kN 的最大预压缩力。然而，为了提高灵活性，许多现代的旋转压片机配备了相同的预压力和主压力，允许用直径 250~300mm 的压轮施加 80~100kN 的压力。

预压后，冲头向产生主压的最终（主要）压轮运动。随着冲头碰撞滑轮，压力一直增加直到冲头平面接触压轮，此时压力达到最大（见图 1）。施加的压力是一个测得值，取决于冲头间的距离和模圈中的物料量。主压后，上冲离开模圈腔，下冲作用于弹射滑轮开始进行弹射过程。随着模圈台继续旋转，下冲把药片弹出模圈腔并把药片弹到刮除点。

2. 压片机设计和布局

现代旋转式压片机一般被设计为单独的机器部分（压片区域）。使压制区域与其他部件隔开的典型部分如下：

- 上凸轮部分；
- 压制部分；
- 下凸轮部分；
- 下机械部分；
- 电机部分。

因这些部位的适当分离，只有压制区接触到物料，因此减少了压片机清洁和转换的时间。除机械部分外，也必须对机器的其他子系统进行了解，如使机器发挥最佳性能的润滑系统和诊断系统（安全系统）。

现代的旋转式压片机可以是单面的也可以是双面的，单面的压片机只有一个加料装置、一个预压装置、一个主压滑轮和一套弹射装置。这些压片机每个冲头位依照模圈台每旋转一次，才生产一片药。双面的压片机有两个加料装置、两个预压装置、两个主压滑轮和两套弹射装置。这些压片机每个冲头位依照模圈台每旋转一次，能生产两片药。双面压片机与单面压片机的操作是相同的，除了余料能从第一饲料装置进入第二饲料装置这一差异外。双面压片机比单面压片机有更大的产率，它的节圆直径也更大，这会导致片重均匀性和可压性问题。

双层压片机和单面压片机一样，使用了相同的总体设计概念。通常双面压片机通过替换不同的凸轮能转换成双层压片机。每层物料被分别导入每个饲料器，并能从模圈

台除去以防止污染。

2.1 上凸轮部分

上凸轮部分通常加以遮蔽和密封以防止物料的暴露。它包括上凸轮轨道、所有的上压轮和所有上压轮的调节装置。上凸轮部分的主要部件如下：

(1) 上冲移动/固定凸轮：上冲在压片机的这个位置装卸。这些凸轮通常直接位于饲料器之上。在许多压片机的设计中，上冲固定凸轮被设计用来测定转动架上上冲的紧缩量。一个用于轻微增加上冲高度（1~4mm）的弹簧负荷凸轮，与邻近的传感器相连。假如冲头太紧，弹簧负荷的凸轮就下降而不是使上冲上升，因此可以与邻近的传感器脱开而使机器关闭。另一种压片机设计中，上冲的紧缩量通过在上冲拉升凸轮上的升力应变仪测量。

(2) 上冲下降凸轮：上冲通过上冲下降凸轮下降进入模圈腔。这个凸轮通常用计算机辅助设计优化，可以使上冲以最小的加速度和速度进入模圈腔。这样，上冲以平稳和可控的方式进入模圈腔，因此使片重均匀度得以提高。

(3) 上预压和主压滑轮插入深度调节器：预压和主压的插入深度都是可以在上凸轮部分进行调节的。插入深度决定了模圈腔中片剂成型位置相对于模圈台上端的位置（见图5）。它可以通过测量上冲进入至上冲头和压轮之间的切线的距离而得。对于大多数压片机，插入深度可以在2~6mm之间改变，一般维持在3~4mm之间。对于预压和主压，插入深度应该维持在大致相同的位置。大多数现代的旋转式压片机，预压和主压插入深度的调节是分开进行的。然而对于许多老式的压片机，预压滑轮是附加装在主压滑轮装置上，它的位置测量是相对于主压滑轮位置的。这样，不管机器怎么调整，预压对主压的比例是固定不变的。

(4) 上冲上升凸轮：在压缩后，上冲进入上冲上升凸轮，上冲上升凸轮可以使上冲离开模圈腔。这个凸轮提供极佳的位置用来测量决定上冲紧缩度的上升力。相对于上冲固定凸轮，这个位置有确定转动架和模圈腔中冲头紧缩度的优点，不仅体现在转动架上而且体现在模圈腔。在这个位置检测冲头紧缩量，几乎能防止所有可能的机器损坏。

(5) 凸轮材质：当转动架旋转时，上下凸轮部分都是使用凸轮来引导冲头。这些凸轮一般都是用不同的材料如钢铁、铜、合金等制成的。大多数转动架上凸轮导轨都可以平滑地引导冲头。许多现代的旋转式压片机使用由聚合物组成的无撞击点的凸轮。这些凸轮质量很高，具有良好的耐磨性和自我润滑性，能最小化凸轮和工具的磨损、产热、噪音，从而可以增加机器的运转速度。不管怎样，能承受撞击（例如弹射凸轮）和应力（例如重力调整凸轮）的凸轮要求金属结构具有良好的撞击抵抗力。出于这个目的，合成了铝铜合金，它具有优良的耐磨性和抗撞强度。

2.2 压制部分

压制部分包括了所有接触物料的部件，例如加料斗、饲料器、余料刮除器、上下转动架、模圈台和片剂刮除器

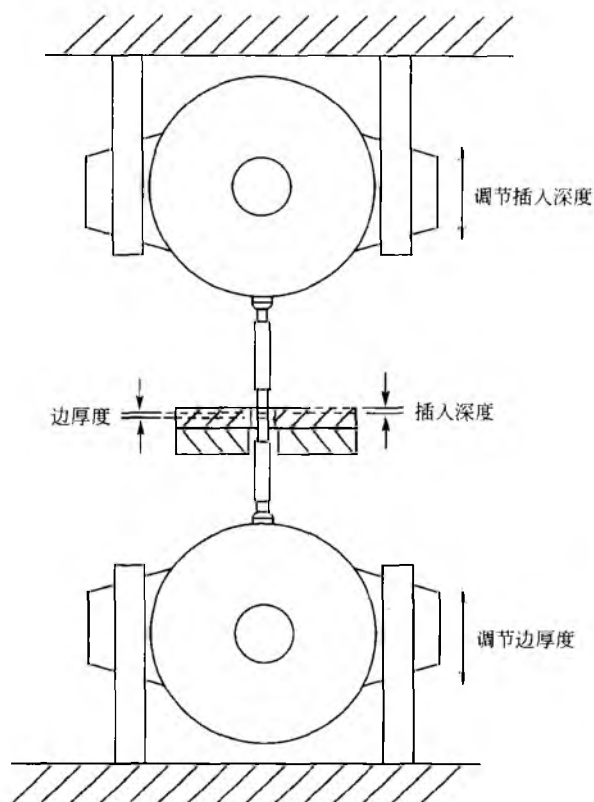


图5 旋转式压片机的布局图

等。此外，粉尘收集罩装在压制部分。这个区域的恰当的护罩确保了上下冲冲头、压轮和凸轮轨道不接触到物料。压制部分的适当保养和设置对发挥最佳的机器性能是至关重要的。压制部分的主要部件介绍如下。

(1) 加料斗：加料斗是饲料系统（见图6）的组成部分。一般地，它能容纳大约5~10kg的物料。物料量监测器包埋在加料斗中，能发射警报信号关闭机器，或者当物料低于这个水平时能激活饲料系统使之传递更多的物料。加料斗应该带有对称的陡峭的卸料角度而促进物料流动，阻止颗粒的漏斗状流动（鼠洞）。加料斗的卸料出口应该尽

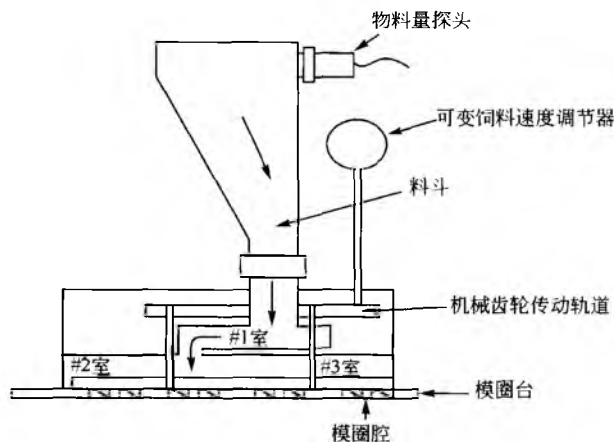


图6 饲料系统

可能大地伸进饲料器以防止物料桥接。

许多压片机上加料斗的基底装有一个阀以致必要时能切断物料流进饲料器。根据颗粒性质,加料阀会引起物料桥接。对于流动性不好的物料,滑阀可能比蝶阀更适宜的。

前几代的压片机往往拥有大的加料斗,但是更新一些的设计提供只安装一个直槽来代替大的过顶的加料斗的选择。这项设计能减少不良流动行为和由于漏斗状流动而造成的分层。

(2) 重力饲料架:老的压片机一般采用依赖于重力和转动架旋转力来完成模圈加料的重力饲料架。这些饲料架对于流动性好的物料性能较好,但是一般会降低机器运转速度。另一方面,这些饲料装置不搅拌物料和不需要能量。因此,它们对于易分层和过度混合的物料是有优势的。例如,对硬脂酸镁的过度混合敏感的产品(例如因为过度混合而脱帽),使用自流式饲料装置而不用压力饲料器有较好的可压性。

(3) 压力饲料器:压力饲料器一般是多室的和多搅拌桨的进料器,如图6所示。这些饲料器对于在机器高速运转、片重差异最小时,获得最佳压片性能是至关重要的。对于具有良好流动性的物料,饲料器应该能以最小的混合把物料从过顶的加料斗移到模圈。大多数压力饲料器拥有2~3个室和搅拌桨。三室/搅拌桨系统一般比二室/搅拌桨系统性能更好。上部搅拌桨和饲料室是直接连着加料斗的,能把物料从过顶的加料斗移到模圈腔上面的饲料室。最上面的室消除了物料流动时顶部压力的影响,因此不管加料斗中有多少物料都能做到均匀地模圈加料。另一种可供选择的系统有料量监测器,以保证饲料室中物料量恒定,因此也能消除物料流动时顶部压力的影响。

压力饲料器室中有用来防止物料不规则堆积的隔板,不规则堆积会导致不均匀的填充。最佳的系统是提供最小的能量输入和颗粒混合,而能获得均匀的填充。搅拌桨速度可与使片重差异最小的模圈台速度同步。适宜的搅拌桨速度通过使用能显示压力标准偏差的力控制系统来决定。最佳的饲料速度由调节饲料器速度来完成,以达到压制力标准偏差最小、相应的片重差异最小。

长方形的搅拌桨设计一般用于使饲料器中粉末混合最小化。然而,对于因颗粒间摩擦而引起的流动性不好的物料(加料斗中桥接),可以设计圆形(或者楔形)的搅拌桨靠加压使颗粒间滑动而提高流动性。在这种情况下,圆形搅拌桨会产生可能影响均匀性、压制性和溶出度的混合效应。

饲料器在模圈台面上的高度对最小化物料损失和防止低熔点物料的结垢是非常重要的。饲料器高度通常维持在0.05~0.10mm之间(0.002~0.004in.)。极细的颗粒可能要求饲料器高度为0.025mm(0.001in.)。

(4) 余料刮除器:余料刮除器直接安装在饲料系统之后,在片重调节后能刮去模圈台上多余的物料。它在安装时是最容易被忽略的,尽管它是压片机中最关键的部件之一。一般使用铜刮除器,它位于弹簧拉紧下的模圈台上。

物料在凸轮下降前被刮除。铜刮除器把多余的物料引进再循环通道。在刮除上冲入口处后,冲模上方的键键尾覆盖了模圈腔。这种设计减少了由于高旋转速度带来的物料飞出模圈腔的不可控制的物料损失。

(5) 预压和主压轮:在模圈填料和刮除之后,冲头旋转到预压位置,初始力作用于压紧物上。在预压阶段,片剂往往局部成型。随后,在主压轮的牵动下,上下冲头一起运动,片剂也就最终成型。主压轮通常比预压轮要大。然而,最新的研究显示有相近负载能力的预压和主压轮的尺寸相近时,片剂成型最佳。压轮由保险工具钢制成,表面坚硬。

因为粉末的可压性是时间依赖性的(这种相关性的精确程度取决于主要的变形模式),最终的片剂性质不仅取决于最大压力还取决于这些力作用和移除的速率(变形速率)。在一台旋转式压片机上,变形速率由冲头与压轮直径之间的切线速率决定。冲头的切线速率是压制速度和模圈台圆周长共同作用的结果(即模圈台每分钟转数 $\times 3.14 \times$ 节圆直径)。随着切线速率的增加,压制速率和解压速率增加,而整个压制时间减少。滑轮直径对压制速率和解压速率都有影响。随着直径增加,压制速率和解压速率随之减小。

一台压片机要发挥最佳压片效率,就要提供带有可灵活调节高预压力和高主压力的多级压缩过程(一般100kN最大)。滑轮直径应该尽可能大,以提供尽可能小的压缩和解压速率。假如存在压制问题,通过低速压片和在具有小的节圆直径的压片机上运转才能实现最长时间压片。

如前所述,对某些类型的产品,预压力超过主压力可能增加片剂硬度。作者发现对于脆性断裂为主的材料,给予比主压力大的预压力能够增加片剂的硬度。然而,具有弹性性质(例如材料易于帽化和成层)的材料,情况往往不是如此,因为这些产品要求渐进地用力以减少弹性回复并允许应力松弛。

大多数重吨位的机器(80~100kN的力用于预压和主压)上部和下部的压轮之间没有机械连接。因此,对于这些机器,上冲插入深度的移动并不会导致下部压轮位置的同等移动。压轮安装在一个阻滞装置上,这个装置是通过一个偏心的或垂直的滑板来调节的(见图5)。当滚筒经过所有可能位置时,偏心调整通常可以轻微的校准中心偏位,而垂直滑动调节往往使滚筒保持沿着中线。旧式的旋转压片机的滚筒附加在摇臂上而且一边安在机器顶部或底部。对于上部的压筒,摇臂的另一边机械地和矮处的摇臂连在一起。这样,调整插入深度会导致上面和下面滚筒位置的同时调整。随着偏心滚筒的调节,在滚筒经过所有可能的位置时,摇臂位置的调整会导致轻微的偏心校准。

尽管多数旋转压片机通过在压制时保持固定的滚筒位置来运行,一些设计包括一个压制补偿器系统,其中的压片反作用力是空气压力。这个系统压到一个恒力,当达到了预先设置的力时滚筒被允许运动。在这种情况下能够增加维持在峰值(大约是最大力的90%)附近的力的时间。



当允许片子厚度有较大变化时,压到一个常力理论上应该提供一个更均匀片子硬度和一致的溶出度曲线。

(6) 片子刮除器: 片子刮除器将片子从下冲刮下, 并使它们沿排出槽滑下。对于高速机器, 必需特别注意片子的脱离以免片子阻塞, 对于异型片, 改进刮除器是必要的, 如图 2 所示。对于高速机器, 将药片尽快从模圈台刮除是十分重要的。在一些情况下, 重新放置盖在片子刮除器上的用于产生片和盖子之间最小空间的树脂玻璃, 可能会阻止片子的清除。应该时时检查刮除点下冲的高度以确保它不低于模圈台表面。通常刮除点下冲应该比剥离点的模圈台表面突出大约 1~2mm。对于深凹的片子, 突出的高度可能要大于 2mm。

装有单片排出装置的压片机在刮除点将片子排出。基于冲头位置的压力, 用压缩气体喷出或机械的快门将单片分类。单面机器(36 冲)中, 两个系统对于大片和小片都适用。但是, 双面的高速机器可能在高速压片时大片会出现问题。

(7) 物料的再循环: 物料从转动架的中心再循环到供料架。一些压片机的设计引入凹陷的再循环通道以减少粒子磨损, 并防止过多的物料损失到真空系统。不要再循环太多的物料这一点是很重要的, 因为这会导致低产率还会破坏粉末的物理性质, 从而导致可压性、均匀度和最终性质变差(如溶出速度降低)。

颗粒再次进入饲料器的点, 与当填充凸轮和模板表面齐平时下冲进入填充凸轮的地方一致。因此, 从再循环通道出来的材料是与下冲面接触的材料, 是先装入每个模圈腔的材料。当出现压制问题时, 应该对进入再循环通道的物料的影响进行评估, 物料的影响可能与下冲有关。一个例子就是颗粒只黏在下冲而通常不会黏在所有压片机上。此外, 这些颗粒润滑性不好, 易脆和受到最小的脆性断裂。先前的实验显示, 随着粒度减小, 弹射力和黏片趋势增加。对这种产品, 可以确定, 过多的物料进入再循环会导致粒度减小、黏片趋势增加。然而, 黏片问题只发生在下冲, 因为粒度减小的物料只接触到下冲。降低黏片问题有以下两个方法: 减少进入再循环通道的物料量, 重新把物料从再循环通道送入饲料器, 和其中大量的物料混合, 因此能阻止它直接接触到下冲。

(8) 除尘: 适当的除尘对保持压片机长期高速度运转是必要的。整个压制区域应该遮蔽起来以减少灰尘渗入压片机其他区域的机会。有效的除尘能使粉尘和油污对片剂表面的污染减到最小, 污染可能导致生产出合格的药片。不适当的除尘会使过多的物料积累在上下冲, 导致冲头过紧。然而, 除尘同时要避免大量物料损失。假如除尘的级别太高, 则模圈腔和再循环通道中的物料都可能被除去。此外, 除尘系统会优先排除细颗粒。因此, 假如颗粒是直接压片混合物, 且活性成分粒径很小, 降低除尘级别和减少再循环对防止活性成分损失是必要的。

2.3 下凸轮部分

下凸轮部分是完全密封的, 与压缩区域分开。它包括

下压轮、随着转动架旋转而引导下冲的整个下凸轮轨道、所有下预压和主压轮位置的调节装置。此外, 自动机器调整所需的马达也包含在这个部分中。

(1) 填充凸轮: 填充被设计用来降低冲头以填满模圈腔。下冲填充凸轮一般各种尺寸大小的都有, 选取多大尺寸取决于由片重调节凸轮决定的最终填充深度。压片机生产厂家推荐一种填充凸轮, 这种凸轮中的片重调节凸轮几乎在填充凸轮的圆心处运行。一般的填充凸轮大约范围为 10mm, 增幅为 4mm (如 0~10, 4~14, 8~18, 12~22mm)。特殊等级或者非常浅的填充凸轮 (如 0~6mm) 也有供应。此外一些生产厂家也提供更多的选择, 如范围更窄和增幅更小的凸轮 (如范围为 5.5mm、增幅为 2mm 的凸轮)。这些凸轮在一定情况下填充的精密度更大。然而, 因为凸轮范围窄, 颗粒密度的很小变化可能导致必须在整个运行过程中更换填充凸轮。

填充凸轮选择的灵活性对于特殊的问题有很大的好处。例如, 假如物料是耐磨的, 可以选择浅填料凸轮使得来自饲料器、随后回到饲料器和再循环通道的物料量减到最小。深填料凸轮可能造成饲料器物料过分堆积, 从而导致堵塞、温度升高、颗粒或者润滑剂的过度混合。

(2) 片重调节凸轮: 下冲从填料凸轮运行至片重调节凸轮, 这决定了刮除后仍然保留在模圈腔中的最终物料体积。对于这个单元的合适设计和运行对确保片重均匀是至关重要的。一般而言, 当下冲上升到一个精确和恒定的高度时, 这个单元的运行方式要确保冲头平滑运行和冲头颤动最小。

片重调节单元包括几个关键的决定它运行效率的部件如图 7 所示。下冲在定量轨道上运行, 它维持下冲在一个不变的高度, 这个高度为最终填料深度。为了使垂直运动(和随后的冲头颤动)最少, 下冲的冲头通过压制弹簧负荷的凸轮紧紧与下定量轨道接触。为确保压制凸轮紧紧顶着下冲冲头, 当下冲静止在定量凸轮上时, 该凸轮和下定量凸轮之间应该保持一个 1~5mm (0.04~0.20in.) 的间隙。

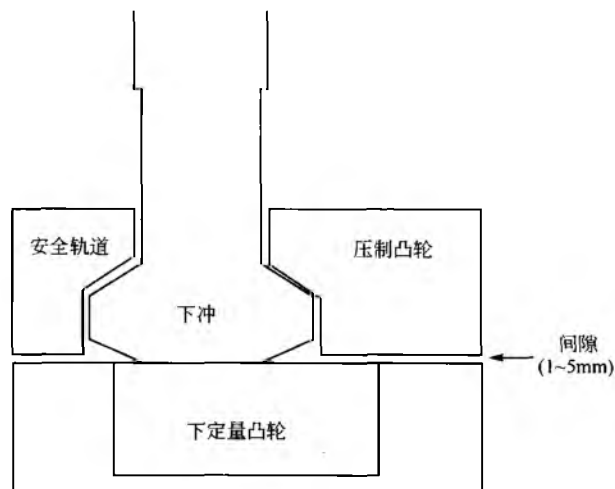


图 7 片重调节单元

在压片机安装期间,在片重调节单元放置一个下冲并确认冲头不会垂直运动,从而很容易检查是否安装到位。在机器高速运转时,这项功能对减小片重差异是至关重要的。在许多压片机设计中,在片重调节单元中还含有一个安全凸轮。

随着下冲离开定量单元,下冲被下凸轮轻轻拉下(大约2mm)。为了减小片重差异,应该定期检查下凸轮的状况以确保冲头下降是否合适。

许多现代的压片机配备了检测下冲紧缩度的装置。这项功能对减少机器损坏和凸轮磨损是至关重要的。如前文提到的,过度的凸轮磨损会增加片重差异。下冲紧缩度传感器一般装在两个位置之一。填充凸轮与片重调节单元之间的转换凸轮是一个理想的测量下冲紧缩力的位置,因为它就是设计用来将下冲高度拉升到最终定量高度的。此外,下凸轮能测定下拉下冲时的反作用力。

(3) 下冲制动器:大多数旋转式压片机配备了下冲制动器,它是聚四氟乙烯树脂镶齿的,是弹簧负荷的能使用恒压刹住下冲的制动器。另外,一些制造厂家把压力作用到摩擦带来阻止下冲。在压片时,下冲制动器作为一个“保留”系统固定住下冲。更为重要的是,在压片机高速运转时,这些系统有助于减小下冲颤动,从而减小片重差异。一些压片机制造厂家使用下冲密封来保持住下冲。

(4) 预压和主压轨道:预压轨道提供下冲从片重调节单元到预压轮的转换支持,而主压轨道提供从预压轮到主压轮的转换支持。最佳的压片机设计用这些凸轮确保下冲冲头平面一直接触轨道表面而提供有效支持。采取这种方法,当下冲通过压轮时,就不会出现其突然的垂直运动。在预压前和压制位置之间下冲的垂直运动可能造成空气进入压紧物底部,导致在下冲面上顶裂。许多压片机依靠下冲制动器或者密封来防止这种运动的发生。在这种情形下,下冲的垂直运动一般只有在这些部件磨损造成周期性的压制问题时才会逐渐出现。

(5) 下预压和主压滑轮厚度的调整:下压滑轮的位置从下凸轮部分开始调整。如图8所示,下滑轮相对于上滑轮(如插入深度)的位置决定了药片的边缘厚度。一般地,边缘厚度被机器控制面板显示在显示屏上。然而,边缘厚度的调整实际上只是下滑轮位置的调整。对于在上下压轮之间并没有机械联系的机器来说,控制屏上显示的药片边缘厚度只是说明在边缘厚度校正过程中设置特定插入深度是有根据的。不管怎样,对于一些电子的全自动的压片机,在调整插入深度时压片机自动地移动下压轮以保持药片边缘厚度相同。

(6) 弹射轨道:在压制后,下冲碰撞弹射轨道(或者在一些压片机上的弹射滑轮)。碰撞后药片脱离模圈壁,随着机器旋转而开始从模圈上移。弹射轨道应该是由坚硬的、耐磨材料制成,如铝铜合金。

(7) 刮片轨道:在经过弹射轨道后,下冲利用刮片轨道提供一个刮片所需的固定的高度。下冲刮片高度能调整到最佳的单片剂弹射高度或者刮片高度。

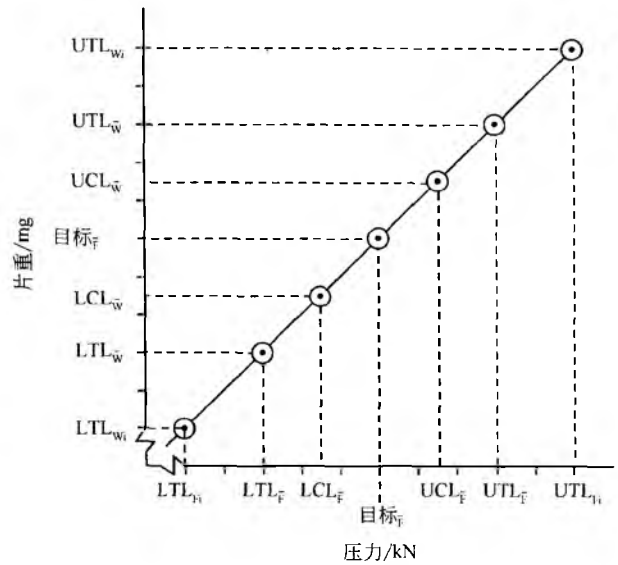


图8 压力与质量的关系

(8) 力过载系统:大多数压片机配备过载系统用于防止机器和冲头损坏。如前所述,压力与其说是一个设定值,倒不如说是从给定的冲头距离和模圈中物料量获得的一个测量值。在大多数压片机中,可以设定允许的最大压力。实际上设定的这个力是测定的压力的反作用力。假如压力超过这个反作用力,压制装置将后退以减小该力。大多数压片机在下压制装置上使用液压、空压或者弹簧负荷的系统(预压和主压都是如此)。在这些系统中液压或者弹簧负荷的系统按模圈中测定力进行校正,在超负荷的情况下,立即移动。一些更新的压片机使用应变计量表准确地测定实际的过载压力(而不是力控制)。在这些系统中,当测定的力过载时,压片机机械地移动压制装置。因此,既然这些系统反应没有像液压、空压或者弹簧负荷系统那么快,那么它们一般有一个安全范围,以指导在达到实际设定值前的过载条件(如最大设定值的95%)。

2.4 下机械部分

下机械部分包括主要的驱动马达、变速箱、液压泵、润滑油泵和信号分配线。下机械部分中合适的通风和冷却对防止机器损坏和减少产热是必要的。对于热敏感的物料,这个部分应该配备冷却系统,如含有易于贴片和黏冲的低熔点成分。

2.5 电机部分

电机部分包括所有的电控制器和部件,如程序控制器、继电器、保险丝,信号分配线和集成的或者远距离的压力控制系统。在很多机器上,电机部分与压片机的前面相连,以减小所需空间。然而,现代化全自动的机器采用对机械振动、粉尘和热度都敏感的计算机。因此,这些电子设备需要放置在远离机器的地方。

2.6 润滑系统

在操作中,大部分高速旋转的压片机采用自动的润滑系统。有效的冲头润滑对转动架道中、凸轮轨道中和压轮下的冲头的运动是必要的。冲头润滑系统在使凸轮和工具的磨损最小化并减少机械发热时,允许机械长时间高速运转。

润滑泵通常位于较低的机械部分,允许润滑间隔和持续时间的可变。输送的油量通常由连接到分配支管的油分配喷嘴决定。上冲的冲头平面经由装在上冲维持凸轮或下降凸轮中的毛毡垫圈而得到润滑。在很多现代设计中,上冲体也需要润滑。冲体由在转动架上放射状的孔润滑,通过转动动力将油运送到冲头,或者通过过度润滑冲颈,通过重力向下传送到冲体。因为上冲柄与上面的转动架接触面积最大,上冲柄的润滑对允许机械的高速运转至关重要。这些位置润滑的不足会导致机械发热和金属膨胀,最终会导致机械故障和严重的损害。

下冲在冲颈润滑。冲颈的两个侧面由油路频繁供油加以润滑。因此,重力使得油在整个冲头上分布。下冲体通过转动架上放射状的孔润滑。

所有配备冲头润滑系统的压片机都需要油和粉尘封闭器以防止产品中的油污染和转动架冲槽的粉尘污染。这些封闭器通常是双片的,如此设计是为了在一边隔离油,在另一边隔离粉尘,正如先前提到的,一些压片机的设计采用了下冲封闭器来保护下冲。

不充分的冲头润滑会导致过度的机械发热,这会影响片剂的性质。颗粒主要经历弹性变形和塑性变形就是一例。这通常出现在没有自动润滑系统的压片机上。产品需要按批生产,在开始的生产中,冲头先经过润滑再装到机器中。在第一批的生产中,能较容易地维持片剂的硬度和厚度的合格。然而,随着产品的生产进入第二批,第三批,片剂的硬度有增加的趋势而厚度仍然保持一致。因此,要对机械进行调节以维持硬度和厚度在规定范围内,但是最终,在厚度没有超出范围的情况下,硬度不能维持在最大限定值以下。检查机器发现下冲更热。将部件拆下,清洗,润滑并重新装配到机械上。重新开始生产,片剂又回复到原先的特征。这种情况下,缺少与批生产相结合的冲头润滑系统会导致机械发热。对于弹性材料,温度增加又会引起更大的塑性和更多的压力松弛,这可以改善产品的可压性。虽然在很多情况下,这种效应是有益的,但在现在的情况下,改善的可压性会使产品属性超出规定范围。在每一批产品后,将冲头拆下,清洗并润滑,可使这一问题得以解决。

3. 仪器化

现代旋转式压片机一般都配备了测量预压力和主压力的仪器。此外,药片弹射力的测定和监测可能有助于具体生产问题和生产故障的解决。然而,对于大多数药品,恰当的产品开发和优化工作消除了为弹射力而装配仪表的必

要性。旋转式压片机也能配置测定上下冲下拉力的仪器。这些测定主要用于探测运行中的冲头,对于生产机器,只有当机器监测系统能使用直接压力测量来实现这些功能时才是有必要的。药片刮除力也能测定,但只推荐用于开发型的压片机上。刮除力一般低于6N,因此药片刮除器的仪器化要求高灵敏度的仪表,这种仪表易损坏。

预压和主压力通常通过上冲测量^[20,21],这些力一般是通过装在完全惠斯登电桥上的应变计量表测量^[22]。应变计量表主要是电阻器,应用于特殊方向的金属表面,有负载后,部件偏移,张力改变计量表的阻抗,阻抗的变化大小和外力成正比。然而,由于设计不同,一些压片机测量下压力而不是上压力,压力应该在尽可能接近于压片的部位测量,为了最准确的和可重现性的读数,压力计应满足压片冲程,而不是处于远距离的偏离中心位置。在现代旋转式压片机上,用安全销来支持压轮是很容易实现的。然而,当压轮的位置改变时,这个销不应当是旋转的。因此,这套系统是很适合于通过垂直滑动机制而不是偏心机制来改变滑轮位置的压片机。安全销一般是定制生产的,它的质量不仅取决于销的设计而且取决于应变计量表的感受性和布局。

许多现代旋转式压片机使用常规的测压元件来测定力,这些测压元件高度准确、耐用、容易更换和校正。然而,力测量的最终准确性和重现性不仅取决于测压元件的质量,而且取决于压片装置的设计和在这装置中测压元件的位置。

使用摇臂来将上下压片装置连接的压片机通常是把应变计量表置于上摇臂或者是连接装置上。应变计量表的应用点收缩成颈状,以增加这些部件的灵敏度,这些仪器化的部件应该在机器上校正,以反映其他压片机部件对力测量的影响。

力测量系统(应变计量表或者测压元件)应一年校正一次或者由于任何原因在拆卸压制装置后加以校正,校正应在机器上进行以确保准确性。它一般是使用改进的冲头和校正的测压元件在压轮下旋转以产生负荷时进行校正。将压片力测量系统的输出与校正的测压元件的输出相比较,许多压片机的生产厂家使用单点校正法来校正应变计量表系数,以使这两个输出结果在该负荷等级上是相同的。随后,测试不同的负荷等级,确定压片力测量系统和校正测压元件之间的误差。另外,可以对系统施加最小和最大压力之间的负载。记录从校正负荷单元和压片机压力测量系统输出的结果,然后,对这些数据作一个线性回归,对整个压力测量范围计算一个新的压力计量因子。随后,测试不同的负荷水平,计算读数之间的误差。

压片机控制和自动化

常规的旋转式压片机是通过定期从排出滑槽取出药片样本,并检查这些药片的片重、厚度和硬度来加以控制的。假如片重处于规定的控制限之外,操作者就通过调整填料深度(增加填料深度就增加片重,减小填料深度就减



小片重)来增加或减小片重;假如药片的硬度或者厚度之一要求调整,操作者一般通过调整主压或者预压之一的药片边缘厚度来实现。因为在药片硬度和厚度之间存在一个反相关的关系,操作者通常减小边缘厚度来增加药片硬度(减小厚度)或者增加边缘厚度来减小药片硬度(增加厚度)。

压力和片重控制系统使用与常规的压片机相同的基本概念。压力控制系统监测药片压力和调整填料深度以维持一个恒定的力。压力控制系统独自地补偿不同颗粒的流动性和密度差异,以维持一个恒定的填料量;另一方面,片重控制系统与压力控制系统一起作为二级控制回路,代替机器操作者定期地获取药片、测量药片的片重、厚度、硬度等手动操作。如果片重控制系统指示需要调节片重,压力控制设定点或者药片边缘厚度加以改变,导致压力控制系统的填料深度的改变。

1. 压力控制

在压片过程中,滚筒间的距离是恒定的,除非为改变片子的硬度或厚度而对机器进行调整。另外,所有的加工尺寸(加工长度和模圈腔大小)都是符合制定标准的恒定值。在这种情况下,对于一种特定的密度均匀的材料,如果每个模圈装的物料体积一样,每个冲头位的最大测定压力也是一样的。相反,如果每个模圈装的物料体积不一样,每个冲头位的最大测定压力也是不一样的。这样,为维持一个恒定的压力而对填充深度(填充体积)的调整将会导致相同的片重。这个观念是所有旋转压片机压力控制系统的理论基础。

这种压力控制系统假定对于特定颗粒、加工设定和机器片边缘厚度(即压缩滚筒间的距离),片重和压力呈线性关系。在特定的机器片边缘厚度(如图8所示)时,通过确立压力和片重的关系,压力控制系统能够通过保持压力恒定而维持药片质量不变。另外,压力控制系统能够监控每个压力,并能在压力超过某一确立的限度(包括平均压力和个别压力)时剔除药片,因而基本上监控了每个药片的质量。

利用压力控制系统的第一步是要确立压力对片重的关系,以便能够进行合适的压力控制设定点的计算,这个点与希望的片重控制点相对应。表1给出了片重控制点和理论产品的允许限度。

表1 片重控制点和允许限度

项目	描述	规格/mg
UTL_w	单个片重的允许上限	105.0
UTL_w	平均片重的允许上限	103.0
$Target_w$	目标平均片重	100.0
LCL_w	平均片重的控制下限	98.5
LTL_w	平均片重的允许下限	97.0
LTL_w	单个片重的允许下限	95.0

起初压片机在目标条件下运行来生产合格产品,例如,片子在平均压力是10kN、100mg的目标条件下的生产。确立这一点后,调整填充深度来增加或减少片重,并对相应的压力进行测量。在提供的例子中,片重增到103mg平均测量压力大约是13kN。这个过程需要对几个不同的片重进行重复。这些数据用于回归分析以便来计算与图8和表2所示的质量控制点相对应的所需的压力设定点。

表2 压力设定点

项目	描述	规格/kN
UTL_F	单个压缩力的允许上限	15.0
UTL_F	平均压缩力的允许上限	13.0
UCL_F	平均压缩力的控制上限	11.5
$Target_F$	目标平均压力	10.0
LCL_F	平均压缩力的控制下限	8.5
LTL_F	平均压缩力的允许下限	7.0
LTL_F	单个压缩力的允许下限	5.0

若不用回归分析,可调整填料深度至所要求的平均片重,记录和设定相应的压力。

用上述的压力控制系统进行正常生产时,压片机会通过调整装填深度来维持压力稳定在10kN(见图9)。大部分的压力控制系统不需要使用者输入平均压力控制范围的高限和低限,因为生产商已经设定了比片重要求更严格的允许限度。压力控制系统通常会每旋转一次计算一次平均压力,并与设定值相比较。如果测得的平均压力偏离了生产商所设定的10kN的压力(即超过厂商设定的允许限度),压力控制系统会通过调整装填深度以维持压力稳定在10kN。如果压力超过了它的平均允许限度(低于7kN或高于13kN),压力机会停机,并拒绝这些药片。在这种情况下,平均片重超出了97.0~103.0mg的限度。通常压力控制系统能调整装填深度以使压力保持在允许范围内。然而,如果物料流动性不好,出现桥接然后冲料,系统不能足够快地补偿来阻止这些超控条件的产生。

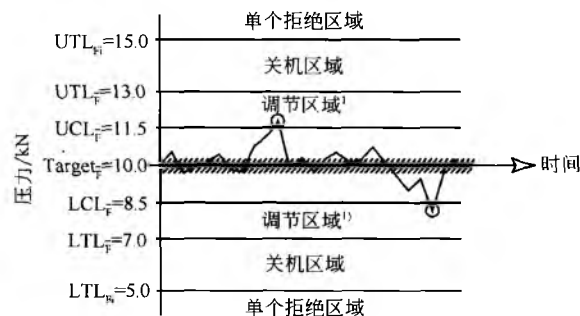


图9 压力控制系统。调节区域相应于片重控制系统,压力调节在一个很窄的区域进行,如图中的阴影区

在整个操作过程中,如果检测到压力超出了允许范围(5~15kN),相应的片重低于95mg或高于105mg,这些药

片在药片刮除点会被拒绝。一些机器的设计不会有效可靠地拣选出单个药片，如果发生上面的情况它会拒绝很多的药片。对于大多数的机器设计，使用者可以规定机器关闭之前每个冲位或每批拣选药片的最大数量。超过了最大值说明冲头有问题的，或该批有过大的片重差异，这也许与安装问题有关。

如上所述，压力控制系统会保持压力的恒定来有效地补偿药用物料颗粒密度的差异，从而得到片重更一致的药片。然而，该压力控制系统的操作仍要求操作者定期检查片重、厚度和硬度。如果在检查中发现平均片重超过了允许的范围，而平均压力仍然恒定在所设的值，操作者就必须采取如下措施之一：

- 将系统调到人工模式（关闭压力控制系统），通过增加或减小必要的装填深度来调整药片的片重。一旦片重符合要求，将压力控制点调节到目前所显示的数值，将系统调回到自动模式。

- 在自动模式中，增减压力控制系统所设的数值而使片重相应地增减。例如，通过增加压力设定点，压力控制系统增加了装填的深度来满足增加片重所需的更大的压力要求。压力机稳定后检查片重，进行调节直至片重合格。

- 在自动模式中，增减机器的药片边缘厚度相应地增减片重。例如，增加机器的药片边缘厚度，所测得的压力减少了。压力控制系统将增加装填深度以回到其原来的压力，从而增加片重。

在压片过程中，压力与片重的关系发生较小变化的情况是比较常见的。这可能是因为颗粒压缩性的改变或是由于整个运行过程机器的改变所致（如温度的改变）。

在采用压力补偿系统的压片机中，依次压制，直至稳定压力，并允许滚轮运动，操作原理与压力控制系统一致。然而，这些系统测量滚轮位置而不是压力，并将其与片重相关。

2. 片重控制

片重控制，作为压力控制的二级回路，允许压片过程的自动化。片重控制系统（如图 10 所示）维持了上述的压力控制限度。机器假定操作者在现场并定期取样以测定片重。取样要求与人工操作有相同的时间间隔和药片数量。大多数的片重反馈系统测量单个片重和计算平均片重以进行反馈。

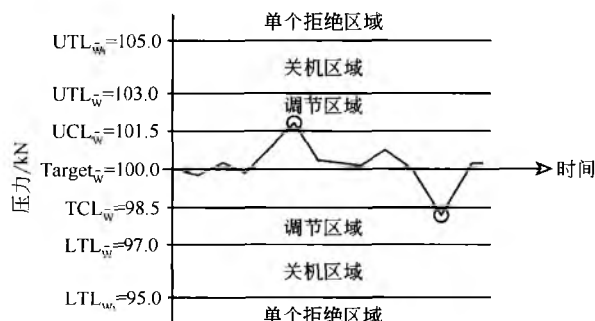


图 10 片重控制系统

在如上所述的例子中，假定片重反馈系统每隔 15min 测量 10 个药片的片重。压力控制系统在运行且保持它的平均压力是 10kN。如果每隔 15min，检查一下，10 个药片的平均片重在限度之内，片重控制系统就不要进行调整（图 10）。另外，如果 10 个药片的平均片重不在限度之内（即高于 101.5mg 或低于 98.5mg），片重控制系统会以取决于机器的如下几种方法之一进行变化：

- 增加或减少所设定的压力值以相应地增减片重。新的压力控制值通过生产商的控制算法进行计算。通常在调整之后，片重控制系统要重新取样以确定平均片重是否符合要求。

- 增加或减少机器药片边缘厚度以相应地改变药片质量。新的压片机药片边缘厚度的设定由生产商的算法进行计算。在设定后，要调整填充深度以维持压力的恒定，片重控制系统要重新取样以确定平均片重是否符合要求。

片重控制系统改变了所设定的压力值，结果引起了压力的改变，但药片厚度相对不变。在另一方面，通过改变药片厚度，压力在压片过程中保持不变而药片厚度发生变化。因为这些调整通常很小，两种调整方法一般会产生同样的结果。

如果检查中发现平均片重超过了平均的误差允许范围（低于 97mg 或高于 103mg），或者是单个药片的片重超过了单个药片的误差允许范围（低于 95mg 或高于 105mg），机器会关闭并且拒绝接受这些药片。很重要的是，单个药片的片重超过了误差允许范围，说明压片机剔除系统没有很好地发挥作用。

3. 片重/厚度/硬度的控制与检测

装备了检测药片片重、厚度和硬度的压片机，采用与压力和片重相同的控制原理。这些系统提供了更多的灵活性，用于检测与控制药片的厚度和硬度。然而大多数机械生产商和片剂生产商发现，增加其中任意一种都很难而且花费很大。只检测药片的厚度和硬度，如果超过允许限度就关闭系统的方法在成本上是有效的。以这种方式，没有操作者检测的全自动化操作成为可能。

故障排除

对于物料的可压性和压片机的了解有助于有效地解决生产问题。尽管还没有稳定制粒工艺的替代法，但是可以考察所有影响性能的不同因素来优化产品。通过采用以下讨论的几个概念，可以解决许多生产中出现的問題。

1. 片重差异

较大的片重差异由多种原因造成。对于许多颗粒来说，它们内在的流动性不好可能是主要因素，简单地降低压片机的速度会减少片重差异。另外，优化加料器的搅拌速度来减少压力的标准偏差也会减少这种片重差异。如果片重差异仍然严重，就必须检查以下的压片机部件：



- 必须检查压低凸轮的松紧度,以证实它没有过分磨损,能将下冲顶着定量凸轮。如果之前的产品导致下冲过紧,可能引起该凸轮过早磨损,导致片重差异增大。

- 检查下冲下拉凸轮的磨损情况,以证实它没有过度磨损,它可将下冲拉下使物料在模具腔内的位置低于工作台面。

- 检查多余物料刮除器的状况和位置,以确保它位于模圈台面能将物料完全刮去。

- 可以用不同类型的饲料器搅拌桨来提高流动性,比如圆形的给料器搅拌桨可以用于那些易桥接的物料。要优化饲料器搅拌速度以减小压力和片重差异。

- 最合适的填充凸轮的大小是,填料深度位于它的圆心。

- 最小量物料的再循环对于稳定的流动和填充是必需的。太多的再循环会导致原料的聚集和颗粒尺寸的减小。再循环的通道应该是畅通无阻的。

- 如果大药片的生产要求深的填充量,那么就应该增加插入深度。否则,当冲头从深的填充深度到浅的插入深度时,未压制的颗粒将会被推出模圈,从而造成物料的损失。

2. 产率

产率受很多因素的影响。不幸的是,产率问题直到损失发生后才能发现。通过在安装时对以下这些方面进行关注,这些问题能被最小化。

- 过多物料的损失可以通过确保余料刮除器在模圈台表面刮除而避免。否则,物料将被吸入除尘系统。

- 供料架的高度应该维持在 0.05~0.10mm。对于非常细的颗粒,间隙应该减小到 0.025~0.05mm。

- 填充凸轮要减小从而减少过度充填和物料的再循环。

- 在再循环通道中的物料应该保持最少。因为越多的物料被循环,损失的可能性就会越大。引导物料从再循环通道到供料架的装置要安装好。

- 如果插入的深度相对于填充深度太浅,物料将会被推出模具,进入灰尘捕集系统。

- 过大的给料速度会产生过多的物料再循环和增加物料的损失。

- 减小压片速度是非常必要的。因为压片速度增加,转动架的旋转力会从再循环通道和模圈腔中将更多的压片物料掀到外面。

3. 药片硬度低

药片的硬度受很多原因影响。出于解决问题的目的,应该决定低硬度是否是因为成帽现象或是可压性不好造成的。对于那些不是因为成帽现象所造成的硬度不高的处方,以下几条规则是有用的:

- 对于多级压制,机器应该配备带大直径压轮的预压和主压。

- 预压与主压的比应该调节。对于那些没有成帽现象的药片,预压和主压力应该最大。

- 减小压片速度是以增加总的压制时间。

- 对润滑剂浓度敏感的组分可能由于在饲料器中过度混合而显示硬度不足。假如组分中含有大量的硬脂酸镁或者颗粒粒径改变而增加润滑效果,过度混合可能降低片剂硬度。在这种情况下,饲料器速度应该降到最低值。

4. 成帽现象和分层

由于有很多的原因,片剂成帽和分层是最困难的问题。找到原因通常即找到了解决方法。减轻这些问题的基本概念是在增加塑料变形的同时最小化弹性行为。根据这个问题的确切本质,这个问题可以解决,可以从处方角度进行一些调整;加入一些塑性基质,加入一些黏合剂或增大水分含量。另外,从机器角度看应该遵从如下一些原则:

- 施加压力的速率应该降低,以尽可能逐渐地施加压力。这可以通过减慢压片速度或使用小直径的螺具来解决。

- 预压与主压的比应该调节,以逐渐地施加预压和主压。预压力太高是有害的。

- 应该估计压力降低的影响。在很多情况下,颗粒的压力过大会导致失败。

- 使用大直径的压轮以减小施加压力的速度。

- 模圈腔的磨损和状况要进行研究和检查。如果模圈腔磨损很大,在药片弹射过程中,可能会发生黏滑,从而导致压片失败。

- 冲头的卷曲或损伤会产生成帽现象,此时,这些工具应该重新加工或更换。

5. 黏冲

药片黏冲问题通常与处方组成有关。然而,在小规模的生产中,这些问题不常发生。不管怎么样,一旦一个产品被批准了,很难进行明显的处方更改。要减少这些问题,应考虑以下几个方面:

- 压片热:压片时产热过高会增加低熔点物料的黏片。在压片部位或下面的机械部分采用冷却系统是比较有用的。

- 压片速度:降低压片速度和压力使热量的产生减少。低速延长了物料和冲头表面的接触时间。

- 预压力:消除预压可能会预防黏片。例如,如果压片压力太低了,一些物料会黏附。因此,采用较小的预压力可能会产生黏片。

- 工具状况:当黏片发生时,应该对工具状况进行评估。磨光冲头,采用各种涂裹材料会减少某些物料的黏片。

- 初始条件:初始条件一般应该接近优化情况以避免弄脏冲头表面。如果维持一个压力在最小值以上对于避免黏片是必需的,接近优化的条件就可以避免最初的黏片。

- 药片刮除器:下冲碰撞点相对于药片刮除器应该复位。在许多种情形下,刮除器碰撞的应力可能造成失败和黏片发生。



6. 药片的堆积和碎片

在刮除器上的药片堆积和碎片降低了药片的质量,还会污染饲料器,造成片重差异。高速的机器相比低速的问题更大。这些问题通过研究药片刮除器和下冲的弹射高度来解决。

- 刮除高度: 对许多类型的药片来说(如深凹的药片),在刮除点下冲的高度必须增加以保证药片完全从模圈中被刮除器刮除。

- 改进药片刮除器: 对于异形片,改进的刮除器可以阻止药片的堆积和裂片。

- 塑料罩的高度: 如果药片出现压条或印痕,刮除器的高度应该降低,以使在外罩和模圈之间正好容纳一个药片。

- 药片刮除器: 刮除器撞击的点可能造成碎片。必须对刮除器的高度和位置进行检查。损坏的冲头必需替换或修理。

- 空气加速器: 假如改进药片刮除器不能消除片剂堆积,在片剂刮除器中采用空气加速器喷气可以解决这个问题。

- 静电消除器: 在较潮湿的环境下生产较轻的药片时,静电可能会引起药片的堆积。在这种情况下,安装静电消除器能加以改进。

总结

优化药片的生产要求好的设备和压片物料。设备只是实现高质量片剂的最终目标的一个工具。然而,如果物料流动性不好和可压性有问题,机器的灵活性使得高质量产品的生产成为可能。

参考文献

1. Higuchi, T.; Arnold, R. D.; Tucker, S. J.; Busse, L. W. J. Am. Pharm. Assoc. 1952, 41, 93—96, Sci. Ed.
2. Train, D. J. Pharm. Pharmacol. 1956, 8, 745—761.
3. Nystrom, C. Drug Dev. Ind. Pharm. 1993, 19, 2143—2196.
4. Wray, P. E. Drug Dev. Ind. Pharm. 1992, 18, 627—658.
5. Hoblitzell, J. R.; Rhodes, C. T. Drug Dev. Ind. Pharm. 1990, 16, 469—507.
6. Marshall, K. Compression and Consolidation of Powdered Solids. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy, 3rd Ed.; Lea & Febiger; Philadelphia, 1986.
7. Parrot, E. L. Compression. Pharm. Dosage Forms; Tablets, 2nd Ed.; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1990; 2.
8. Goetzl, C. G. Treatise of Powder Metallurgy; Interscience Publishers, Inc.; New York, 1949; 1, 259—312.
9. Heistand, E. N. Int. J. Pharm. 1991, 67, 217—229.
10. Hiestand, E. N.; Smith, D. P. Int. J. Pharm. 1991, 67, 231—246.
11. Reier, G. E.; Shangraw, R. E. J. Pharm. Sci. 1966, 55, 510—514.
12. Hanus, E. J.; King, L. D. J. Pharm. Sci. 1968, 57, 677—684.
13. Rankell, A. S.; Higuchi, T. J. Pharm. Sci. 1968, 57 (4), 574—577.
14. Fette Technical Bulletin 8004; Fette America Inc.; Rockaway, NJ.
15. Esezobo, S.; Pilpel, N. J. Pharm. Pharmacol. 1986, 38, 409—413.
16. Gunsell, W. C.; Kanig, J. L. Tablets. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy, 2nd Ed.; Lea & Febiger; Philadelphia, 1976.
17. Hiestand, E. N.; Peot, C. B.; Ochs, J. E. J. Pharm. Sci. 1977, 66, 510—519.
18. Bateman, S. D.; Rubinstein, M. H.; Thacker, H. S. Pharm. Tech. Int. June 1990, 30—36.
19. Rippie, E. G.; Morehead, W. T. J. Pharm. Sci. 1994, 83, 708—715.
20. Watt, P. R. Tablet Machine Instrumentation in Pharmaceutics; Principles and Practice; Ellis Horwood; Chichester, UK, 1988.
21. Oates, R. J.; Mitchell, A. G. J. Pharm. Pharmacol. 1994, 46 (4), 270—275.
22. Schmidt, P. C.; Vogel, P. J. Drug Dev. Ind. Pharm. 1994, 20, 921—934.

(赵炎龙 译)



压片机的仪器化

Michael Levin

Metropolitan Computing Corporation, East Hanover, New Jersey, U. S. A.

引言

本文旨在帮助配方设计师、工艺工程师、验证专家、质量保证人员和希望了解制片工艺采用的基本标准和技术的人员了解压片机仪器化的一般原理和优点。

压片机仪器化的历史

1952年至1954年间, Higuch 和他的小组^[1]给一台偏轴压片机的上下冲、弹出和冲杆位移装备了仪器, 开创了压片过程的现代化研究。该小组的成员 Nelson^[2,3]随后又继续了这一工作。

1966年 Knoechel^[4]及其同事获得压片机压力测量的美国专利, 随后又在 *Journal of Pharmaceutical Sciences* 刊登了两篇关于仪器化旋转式压片机实际应用的专题文章^[5,6]。从1973年起又先后出现了数个关于压片机仪器化和控制的专利^[7~15]。

尽管仪器化旋转式压片机的设计已经发表, 关于材料压制性能的早期研究工作主要还是在仪器化的偏轴式单冲压片机上进行的, 因为传感器安装相对容易, 而且可测量冲杆移位^[16~18]。

20世纪80年代中期有了关于专用压片机监控系统的描述^[19,20], 并出现了第一批商用仪器化配件包, 可用于产品开发和压片控制。第一个电脑控制的压片机监控器在1987年销售, 第一个基于微软视窗系统的压片机仪器化配件包在1995年上市。

随着1976年仪器化压制模拟器的出现^[21], 压制技术研究进入了一个新时期, 但压制模拟器专利到1996年才颁布^[22]。

2000年出现了机械压片机复制器专利, 从而产生了新一代的“压制模拟器”^[23]。

早期的压片机仪器化以及相应的研究在 Schwartz^[24]、Marshall^[25]和 Jones^[26]的综述文章中作了介绍。全面的综述可参考 Celik 和 Ruegger 最近的一篇论文^[27]。

有关压片机仪器化的其他历史情况, 建议详阅 Ridgeway Watt 的著作^[28]。有许多关于各种仪器化的论文发表; 在 Munos-Ruiz 和 Vromans 最近的著作中^[29], 有两篇关于这一内容的好文章, 但可惜只是粗略提到单工位压片机和仪器化的冲头。

数据采集原则: 从传感器到计算机

监控和控制一台压片机需要在压片机的特定部位安装

传感器。传感器通常是将能量从一种形式转换成另一种形式的装置(例如把力转换成电压)。压片机传感器一般是测量力、旋转速度或冲头位置。由于从这些传感器来的信号通常是毫伏, 因而需将其放大, 并转换成数字形式以便由数据采集系统处理。

1. 压电传感片

历史上早期的仪器化压片机采用石英晶体制作高阻抗压电传感器。当受到应力时, 晶体积累静电荷, 静电荷与作用力成正比, 低阻抗和高阻抗(更为现代化)压电传感片具有高频响应, 但因漏电易产生信号漂移(现代压电传感器中可见到每秒约有0.04%的衰减)。目前压片机仪器化倾向采用的是应力传感片。

2. 应力传感片

应力传感片是薄片状、线状的半导体装置, 将压强或作用力转换成电压。当细导线受到应力时, 会变长变薄, 这两个因素均导致电阻增大。如电流通过时, 受到导线电阻变化的影响, 电流会发生变化应力传感片就是基于这一原理。薄片传感器以其耐用、有用的标示电阻和可靠的灵敏度控制著称, 常用于压片、预压和弹出力的仪器化上。半导体应力传感器本身更为灵敏, 但有电噪音高、温度敏感性高等缺点。这类传感器除了用于测量冲模壁压力和脱模力以外, 一般不用于压片机仪器化。

3. 惠斯通电桥

惠斯通电桥是一种用于保证信号平衡而特别连接的应力传感片(图1)。“全套”电桥由在一个电路内的两对电阻构成, 有两个并联分路用于信号输入, 两个并联分路用于信号输出。通过向电桥输入处施加激发电压(一般为10V直流电), 并通过增加专用电阻改变电桥各分支的电阻值, 可保证当传感器无负载时输出电压为零, 称为零平衡。电桥一经平衡, 电桥任一支内电阻稍有变化就会使输出不为零。

惠斯通电桥的输出通常以毫伏每伏激发电压每单位作用力表示。例如, 灵敏度 $0.2\text{mV}/(\text{V} \cdot \text{kN})$ 表示施加 10kN 的作用力和 10V 激发电压, 将产生 20mV 输出。要使用这一输出, 通常需放大数百倍才能达到伏单位。

电桥的另一个重要功能是平衡温度效应。虽然单个应力感应片对于温度波动敏感, 但惠斯通电桥具有温度灵敏度补偿, 使得整个传感器在受热时输出不会发生明显变化。

由于电桥的输出是毫伏级, 传输信号的电缆的每一根导线一般用编织的或衬有绝缘层的套管屏蔽。套管通常同

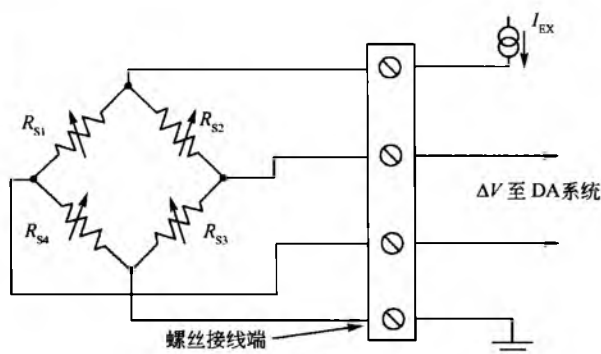


图1 典型的惠斯通电桥应力传感片

放大器连接，但绝不与实际仪器化设备（例如压片机）接触。如违反这一规定，则接地回路可能会产生电噪音，并有严重的触电危险。

4. 应变灵敏系数

应变灵敏系数是应力感应片的一个特性参数。它按照电阻变化相对于引起这一变化的单位应力计算。仪器化压片机采用的应力感应片一般用铜镍合金制成，其应变灵敏系数为2。在一个典型的弯曲梁装置中（例如压辊传感器），薄片的一侧受到拉伸，另一侧受到压缩。通过在每一侧装两个应力感应片，传感器的灵敏度可提高一倍。

应力感应片应安装在对作用力最为敏感的机器部位。这些部位可采用偏光技术测出的压力分布情况来确定。

5. 测力传感器的制作

一般来说，仪器化设计是知识产权，具体图纸是保密的。每一个力传感器是为某一机器零件专门设计的。总的技术规范从制造商批准的图纸中获得。

相同的构件，如销子和凸轮，一般由A2工具钢在全退火状态（软化）下制成。主构件必要时先经退火，然后机加工，再淬火，最后测试至Rockwell60—64，然后磨削到要求的尺寸。

采用偏光束测定应力分布以确定最大应力区，同时避开应力不均匀的部位，这样做是非常可取的。

在专业实验室采用如下典型的工艺制作传感器。薄片型应力感应片采用高性能的100%固态环氧树脂胶黏剂在控制加热温度速度的条件下黏附在钢膜上。在用固体导线（以防止电噪音）完成电桥内接线以后，将一个由金属箔和绝缘编织层组合成的多芯导线连接到电桥。导线的固定采用环氧树脂胶黏剂，并有乳胶基黏合剂或环氧树脂材料保护。引线束外部有聚四氟乙烯保护套，里衬编织屏蔽层。聚四氟乙烯与钢接头处用环氧树脂密封，但不能受应力作用，否则易造成导线束打结或弯曲，把内部编织屏蔽层暴露出来。然后上保护涂层，在比传感器正常工作温度（约175或105℃）高出大约50℃的温度下最后烘烤至少2h。采用硅基黏合剂如RTV填补较大的空隙，可保持较低的弹性模量，避免影响实际应变测量。涂层能承受中等程度的

机械磨损，并能耐受大多数溶剂、油、清洁剂等，但不能防止锐利物件损伤。

接着在电缆上装上高质量的接头，然后用精度为1%的低温系数固定电阻进行零位校正，并按国家标准和技术研究所（NIST）要求进行跟踪性校准。

需要指出的是，一般来说相同的构件由于要求抗拉强度较高，机械加工性能好，不用耐腐蚀钢制成。在存放前必须像对压片机高等级冲模钢那样，对表面进行处理；用酒精拭抹以后涂上一层薄薄的保护油。

6. 测压元件

在某些情况下可采用测压元件代替胶粘结的应力感应片。测压元件封闭腔中的应力感应片电桥，构成完整的传感装置。

同其他传感器一样，它输出一个同所施加负载成正比的信号。但与需要将应力感应片直接用于压片机部件的专用传感器不同的是，测压元件是独立式的，可安装在压片机上一个机加工成的腔洞内，易于更换和维修。不足的是，相对应力感应片传感器而言，测压元件灵敏度较差，不宜测量绝对压力。测压元件可用于单工位压片机的冲模座上。另一个用途是装在一个冲模组件上，用于对压片机现有的传感器进行校准。

7. 线性可调差分转换



图2 线性可调差分转换 (LVDT)

线性可调差分转换（LVDT，图2）是一个装置，它产生与缸体内芯棒位置成比例的电压。它可测出物件相对于预先设定的零位的位移或位置。在压片机上，它用来测出冲头位移和模内厚度。其准确度和精确度通常很高，但在压片机上往往遇到安装或维护不当而带来的具体问题。

8. 接近开关

接近开关（图3）是一种非接触的电磁传感装置，它能感受是否有金属存在。在压片机上，它广泛用来检测测台是否转动、识别工位以及有助于片剂压力控制器中峰值的检测。

9. 仪表放大器和信号调节

信号调节主要包括产生激发电压以及增益的放大器，把应力感应片电桥输出的毫伏级电信号转变成伏特级，供数据采集装置输入。

仪表放大器与其他类型放大器的不同之处在于，它将传感器电桥各边来的信号分别放大，然后将两个被放大信号之间的差值再次放大，结果使传感器两边的噪音减小。

某些仪表放大器还具有滤波功能，滤波电路包括电阻

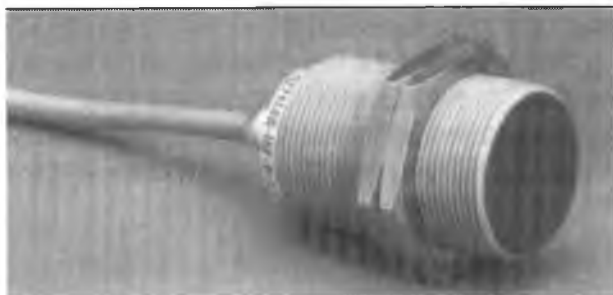


图3 接近开关

和电容。其作用是截止不需要的频率。事实上，良好的传感器应产生一个干净的信号。采用模拟滤波器或数字滤波器可能造成某一重要部分的待测信号损失。频率滤波器可能会使被测的压片信号峰值向峰值的后缘方向偏移，产生一个比实际峰值力小的结果。

由于滤波器使信号变形，故应尽量避免，除非迫不得已时。电子元件的改进往往使得滤波器被淘汰。例如，若采用现代化快速数据采集系统进行信号处理，则对于压片机来说，用于低采样速率下调节高频信号的所谓防混淆滤波器就不再需要。

除了放大、激发和滤波外，信号调节装置还有隔离、分压、过电压保护和电流-电压转换的作用。

10. 仪器化术语：定义

有关传感器和信号调节的若干重要术语可定义如下。

- 量程 (FS)：传感器设计要求达到的全工作范围。它的定义是施加最大负载时的传感器输出。

- 激发：施加于感应片电桥输入端的电压。

- 准确度：与被测变量的真实值接近的程度。它定义读数误差。好的压片机传感器准确度至少达 1%（例如，压力 FS 为 50kN 的传感器产生的误差最多为 500N）。

- 精确度：测量的重复性，即同一个变量连续读数之间相差多大。假如一个人投掷标枪，其准确度由落标点距目标点多远决定，而精度则是落标点之间相距多远。

- 分辨率：仪表所能检测到的被测值的最小变化。

- 传感器的动态范围：最大量程和最小可检测信号之比，单位是分贝，它表示信号最大值和最小值之比： $\text{dB} = 10 \log (S_{\max} / S_{\min})$ 。某些压片机传感器的动态范围较窄，这不一定与精度相关。例如，一个非常精确、用于测量 50kV 力的压辊针可能检测不出 5kV 信号。

- 校准：在标准试验负载下传感器的输出与一个同样负载水平下的已知标准的比较。表示数据最好拟合的直线称为校准曲线图。

- 校准因子：放大器增益和平衡后，对每 1V 输出，传感器所需的负载值（以工程单位计）。校准因子通常与全量程相比表示。

- 并联校准：传感器的一种试验程序，一已知电阻接到电桥的一个支路。输出应符合校准证书中规定的电压。

如不符，说明有问题，需检查传感器有无损坏，或重新检验。

- 灵敏度：测量到的变化与被测变量的变化之比。例如，一个人吃了 1 磅牛排，但浴室的磅秤显示体重增加 2 磅，磅秤则称为不灵敏（比例远偏离 1）。

- 可跟踪性：传感器校准按主要标准一步一步地传送程序。在任何一个检验程序中，将传感器与一已知标准比较。该标准通常由国家或国际机构制定，在美国这一机构是 NIST。

- 测量误差：全量程内测出的值与读出的结果之差异。这类误差包括但不限于下列各项：

- 非线性：回归直线（数据拟合）上校准点的最大偏差，以额定的全量程输出的百分点表示，并仅按负载增加方向测出

- 重现性：在相同的负载和环境条件下传感器连续输出读数之间的最大差别。它表明仪表在连续读数时给出相同结果的能力

- 滞后：对于同一负载传感器输出读数之最大差异。一个读数通过从零位开始增加负载得到，另一个读数通过从额定全量程负载开始减少负载得到。测量值应尽可能快速地读取，以使测量误差最小

- 回零：两个读数之差，其中一个是无负载时的读数，另一个是施加全量程负载并撤销后的读数

好的传感器综合误差（或最大误差）小于全量程的 1%。

11. 模数转换器

为将传感器的模拟输出（伏）传输到电脑，须将其转换成二进制数字序列。现代模数转换（ADC）板是复杂的高速电子器件，它根据输入分辨率、输入电压量程和取样率分级。

模数转换板分辨率的测量单位是比特（bits），比特（二进位单位）是一个信息单位，它等于一个二进制决定（如“是或否”，“开或关”）。一个 12bits 系统提供一个零件的分辨率为 $2^{12} = 4096$ ，即大约为全量程的 0.025%。同样，16bits 相当于 $2^{16} = 65536$ ，即全量程的约 0.0015%（对压片机用途而言，这一分辨率过高）。

因此，模数转换板分辨率不仅限制动态量程，而且限制总的系统准确度。同样，在一给定的动态量程内，要保持高准确度，要求的分辨率也高。例如，对于一个 0.5% 精度，80 动态量程的传感器要求模数转换器（ADC）分辨率至少为 12bits。

一个弱信号要放大 10 倍或 100 倍，实际分辨率则分别增加 3bits 和 6bits 以上。另一方面，若其他元件如放大器或传感器分辨率低，则提高模数转换器分辨率并不能给总的系统准确度带来好处。

如果输入信号的变化小于系统的最小分辨率，那么这一情况是检测不出来的。例如，对于一个使用 12bits 模数转换器，10V 的全量程（相当于一个输出为 50kN 的压力传

感器),系统发现不了超过 2.44mV (12.2N) 以下的信号。

模数转换板在实际取样率范围方面也各有不同。取样速率单位是赫兹(次/秒)。来自压片机的信号频率不超过 100Hz (每秒压片次数)。为防止混淆(因采样速率低,输入信号分辨率降低),采样速率至少应为信号最高频率的 2 倍。在压片用途中用于数据采集的大部分模数转换板都采用比信号频率高 5~20 倍的采样速率,这就是为什么不需要反混淆滤波器的原因。

12. 电脑和数据采集软件

数据采集系统的总精度是由系统全部元器件中最差情况决定的。应当清楚,大多数系统误差既不是来自传感器(精度 0.5%~1%),也不是来自模数转换器(精度 0.025%),而是来自分析数据的软件(取舍错误、采样速率不当或者算法错误所致)。

数据采集系统的速度和容量取决于电脑处理器和硬盘的技术规格。来自传感器的实时数据被送到屏幕(监控器)和硬盘(用于重放和分析)。一般来说,“实时”处理意味着对研究的现象发生的变化随时进行报告。有意思的是,压片机的高速数据采集和每月平衡开支所采用的家庭会计财务程序都可称为“实时”软件,所不同的只是时间框架。对于一台压片机,采集的数据必须在几毫秒内进行采样和处理(典型的压片动作用时 25ms),而用于家庭的会计财务程序一个月才处理一次数据就行了。

大多数传感器、信号调节器和电脑硬件供应商均遵守实用标准,关于应变片因素、综合误差、灵敏度、模数转换器分辨率、采样率等均有认可的标准。但当比较软件时供应商之间的差别就明显了,因为没有建立统一的用户界面标准。而硬件对终端用户是很明显的,日常所见到的是屏幕、键盘、鼠标。使用软件的便利,在于对传感器的信号分析不受干扰,统计计算的可靠性、图表和报告的质量、系统的可验证性,这一切都保证了数据采集软件的质量。

对数据采集系统适当的验证试验应包括在输入值已知并可控制时,对整个系统误差的计算(如一个 NIST 可跟踪信号发生器产生一个已知振幅和频率的正弦信号,模拟在压片机上的压制动作)。通过将输出值(例如软件所报告的峰值高度)与已知输入值比较,可以可靠地得出整个系统误差。

用于生产和工艺开发的压片机仪器化

1. 研发级别的仪器化

在生产环境中,典型的片重控制装置是由来自压力传感器的信号驱动的,应变片可安装在连接上下压轮组件的立柱上。传感器测量所谓的“主压力”,即作用在上下冲头上力的稀释平均值(diluted average)。也可以采用安放在适当位置的测压元件记录传递来的压力。因测量值不是作用力轴线上取得的,因而在传输中就损失了一部分力。

这一测量值对片剂质量控制是适用的,但即使测量值校准得当,它并不表示压力的绝对值。

研发级别仪器与此不同,它要求将应变片尽可能靠近冲头顶端,同作用力方向垂直对齐^[30]。实际上即要求把应变片放在压轮轴销里,使测量值反映出压力的绝对值。这样就把上下冲头的压力区分开来,从而可以进一步比较不同压片机的压力读数。

2. 压力测量

对于典型的研发级别的压力传感器,在压轮轴销中加工出一个凹槽,用于安装应变片(图 4)。槽的实际形状是传感器的设计窍门,是仪器供应商的知识产权,一般有专利保护。需指出的是,可能会有上部和下部仪器化的压轮轴销。

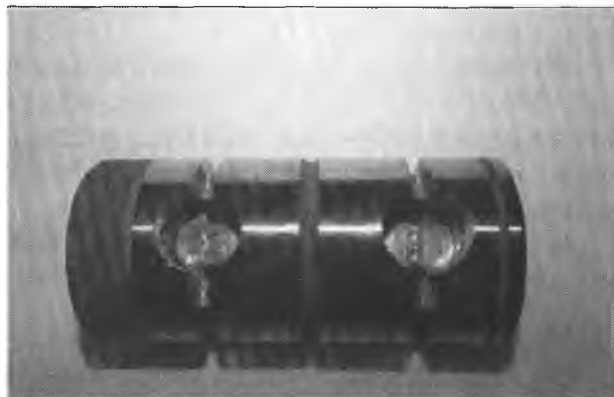


图 4 压力传感器

压力的测定结果同片剂的各种性质有很大关系。随着压力增加,片剂的硬度、质量(在厚度和真密度不变的情况下)以及弹出片剂的力也增加。诸多变量影响到压力,如压片机的设置、压片机速度、冲头长度变化、冲头磨损、配方、赋形剂性质等。

3. 预压力测量

同带有仪器化的压缩轴销一样,上、下预压轮轴销也可用仪器测量。如压片机上有预压轮,可用来去除冲模中粉末的空气并初步压实,有助于使片剂在无顶裂或层裂^[30,31]的情况下达到要求的硬度。预压力通常为主压力的几分之一。

4. 弹出力的测量

设计弹出凸轮的方法有多种。采用一种较好的应变片布置方法(所谓“剪切力”设计)可不要求凸轮表面间断,更重要的是能保证产生的信号具有良好的线性(图 5)。

弹出力大易增加模具与弹出凸轮之间表面的磨损。弹出力也被用来评估(压片机和产品的)润滑是否有效、是否黏冲。弹出传感器的灵敏和线性跟设计有关,如剪切力设计总是优于分裂式凸轮和悬臂梁式设计。

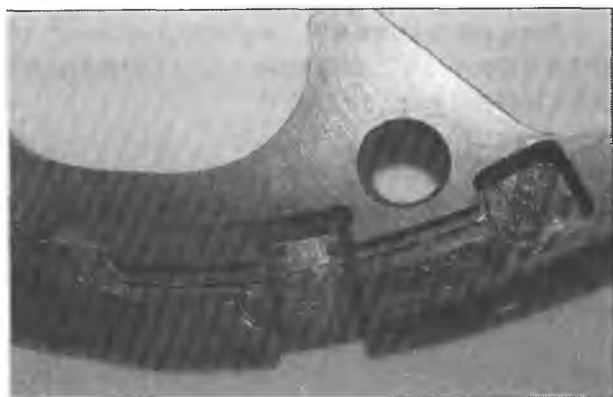


图5 仪器化的弹出凸轮

5. 取片力测量

取片力是通过压片机加料框的一个悬臂梁（位于取片刮刀前，图6）上安装一个应变片来进行监控的，用来测量片剂与下冲表面的黏性。这一黏性是颗粒润滑不良、模具表面设计差、冲模壁有黏滞或片剂顶裂的指示^[32,33]。



图6 仪器化的取片刮刀

6. 速度测量和工位识别

通常用一个转速计数器（接近开关）进行工位识别和压片机测速。它安装在压片机上，用来标记转塔转一圈的开始，使系统软件能够进行工位识别和速度计算。

此外，接近开关的线性排列可标记一个压缩动作的开始和结束（这一信息对片重控制器是很关键的），并可指示出空缺的冲头。

压片机其他部位的仪器化如下：

（1）旋转式压片机的上拉凸轮安装仪表，可用于测量上冲头的拉动力（上冲杆从冲模拉出所需的力）。同样，下冲杆脱卸力是在固定于脱卸凸轮的螺栓上测得的^[34]。在确定压片机工作是否平稳（润滑程度、机器光洁程度及长期疲劳积累情况）时需要这一参数。

（2）在单工位压片机上将 LVDT 接到冲杆上可很容易

地测出冲杆的位移。在旋转式压片机上，可通过滑环、测距仪或可测量冲杆进行这一测量。冲杆位移曲线可与压力值结合使用，可评估压制功和膨胀功的情况（以测量弹性）。由于随着冲压深度的加大，出现顶裂的倾向加剧，因此最好对冲头在冲模内的实际运动情况进行监控。压力-位移曲线的形状反映了压片材料的相对弹性或塑性；对强度大的片剂需要适当的塑性变形，但塑性过大会造成片剂的顶裂和层裂^[35~37]。

（3）通过测量冲模壁径向和轴向压力，可了解材料的压缩机理，同时也指示冲模壁的黏附力。这一黏附力是对下冲头的反向拉力。由摩擦力造成的冲模壁径向压力随材料的不同而不同，在加润滑剂后在冲模壁内分布更均匀^[38~44]。冲模的仪器化有技术难度，因为冲模内壁的压力随位置呈非线性分布，并与片剂厚度有关^[38~44]。

（4）对热敏感组分可进行冲模内温度监控，如布洛芬^[47~48]。

7. 冲杆的仪器化

若干供应商提供仪器化的冲杆，即带有应变片和其他内置仪表的冲杆。这种冲杆可以记录并储存数据并将数据无线传送到一台固定电脑。这类装置是多功能的，能记录压力、冲杆位移或加速度。并且至少在理论上可从一台压片机移动到另一台压片机^[49~50]。但要注意，每一个仪器化冲杆只适用于一种尺寸和形状的模具，并只限于一个工位，这一点与能适用于所有工位和模具报告数据的仪器化滚针不同。另外，仪器化冲杆要么安装较费劲，要么报告的不是冲杆位移，而是无用的冲杆加速度测量值。至今尚不能从加速度计算位移。

8. 研发用单冲杆压片机

单冲杆偏轴压片机常用于配方研制的早期阶段，因它需要的粉末量不多。另一个好处是测量压力和冲杆位移成本较低（冲模平台不转动，因此不需使用昂贵的无线测量技术）。许多基础研究和产品开发在偏轴压片机上进行，主要就是出于这一原因^[51]。负面的考虑是需专用模具（通常是 F 模具），同时，压制速度较旋转式压片机低得多。下面将看到，制片工艺中速度是一个重要因素，因此由单冲杆压片机得到的结果并不直接反映旋转式压片机生产片剂的情况。

9. 压片机仪器化的好处

在压片机仪器化的诸多好处中，配方的“指纹”识别也许是最为明显的。可压性和弹出曲线，以及与压制相关的溶出和崩解曲线，对于每一种配方都是独特的，可用作批记录。为使工艺最优化，可在试验设计时把主压力或预压力和速度因素考虑进去。可压性和弹出曲线可用于赋形剂和润滑剂的评价。其他有用的产品研发和优化工具包括响应面、Heckel 和力-厚度曲线。

如不具备提供片剂的保压时间、密度和压片所需能量

等规模放大参数的仪表测量数据, 则不能获得可靠的科学的生产工艺放大。

在实验工厂和生产车间, 合适的仪器化可进行压片机的故障诊断, 对模具异常、凸轮磨损、黏冲、冲模欠润滑等情况发出警告。最后, 仪器化还广泛用于片剂质量控制。

10. 配方开发仪器化

目前, 相当一部分关于药用材料的压制性能的知识来自仪器化的压片机^[52~56], 许多片剂性质, 如抗拉强度(硬度)和孔隙度可通过压力曲线预测^[57~59]。

压缩功(放样参数之一)可通过适当的仪表获得^[60,61],

有关材料塑性的情况可从力-时间曲线推导得到^[62~64]。

借助仪表研究的现象称为“滞后时间(lag time)”(压制峰值和最大冲头深度之间的时间差)。这一时滞的长短指示正在压缩的粉末的压制机理^[65~66]。

10.1 典型的波形

让我们看一下可以从仪表化压片机得到的实际波形(图7)。请注意标志旋转开始的接近开关显示的黑线。在该压片机上, 预压和压片时间吻合(当然分别对应于不同的冲杆), 随后是弹出和取片。

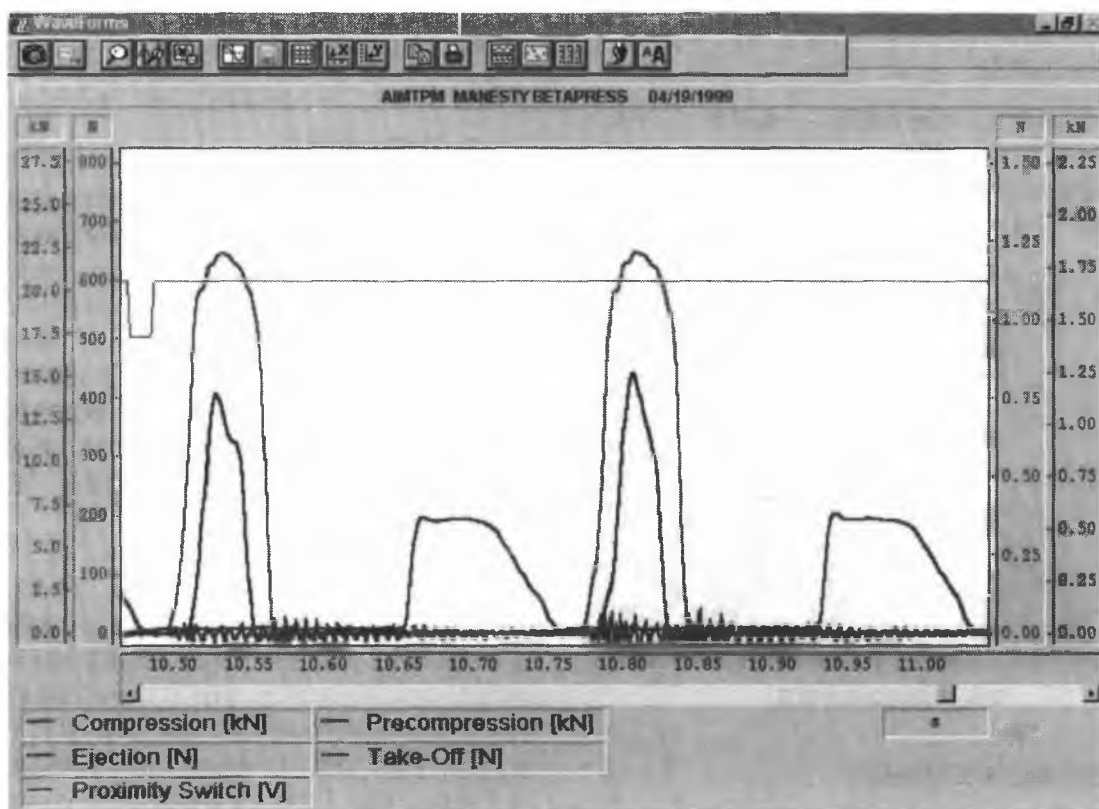


图7 典型的压片、预压和弹出波形

10.2 可压性曲线

将平均片剂硬度对应平均压力峰值绘图, 就得到可压性曲线, 它可使我们比较不同配方或不同的处理速度(见图8)。哪种配方更好? 配方2对于同样压力下制出的片剂更硬。这就是说, 配方2达到所需的片剂硬度要求, 而对生产用压片机的磨损较小。另一方面, 如果硬度公差范围特别窄, 配方2由于斜率大因而在这方面是不利的。

10.3 润滑曲线

颗粒中必须含有一定量的润滑剂, 以减少片剂弹出时与冲模壁产生的摩擦, 同时也能防止片剂黏在冲头上。如无仪器化的弹片凸轮和取片刮刀, 就不可能对润滑剂的合理用量作出客观的评估, “最好”的配方往往到最后才得到。

图9所示曲线可帮助配方员确定最佳的润滑剂用量。当然应尽量减小弹出力(减少生产用压片机弹出凸轮的磨损), 但也要防止在配方中放入过多的润滑剂。

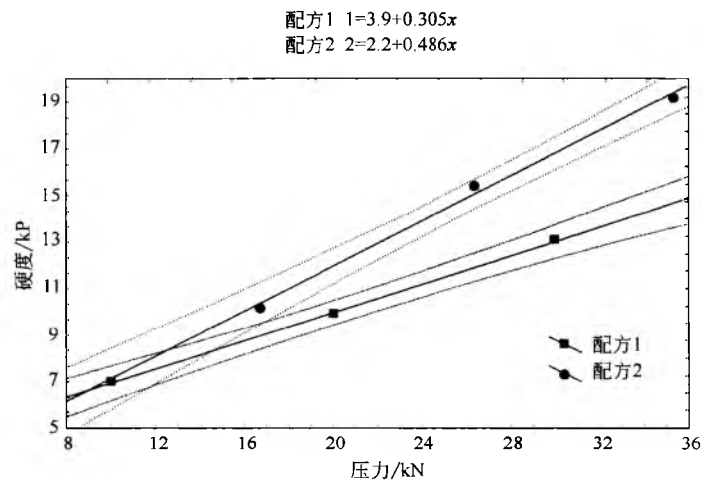


图 8 可压性曲线

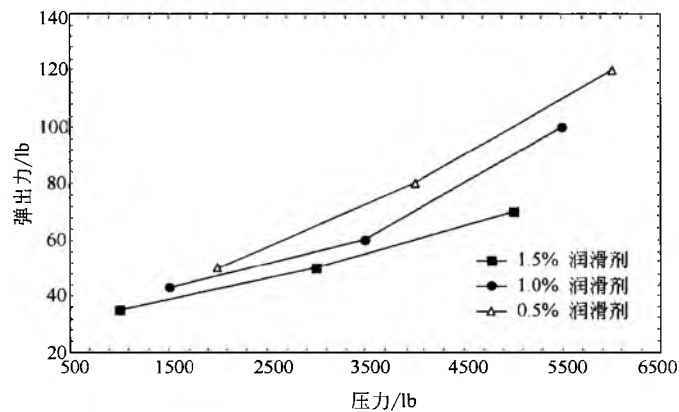


图 9 不同润滑用量时弹出力与压力的关系曲线

由于润滑剂性能与亲脂性材料有本质的联系，润滑剂含量较高的配方会出现活性成分溶出延迟，而溶出速度慢会对药物体内生物利用度产生不利影响。

10.4 润滑剂研究

弹出力传感器的另一个重要作用是对润滑剂（不同化

学成分的润滑剂或不同供应商提供的同样的润滑剂）进行评估。

如图 10 所示，1 号润滑剂较好，因为它所用的弹出力较小。对于润滑剂的研究必须在早期进行。如果对接下来的放样过程中出现润滑剂问题进行纠正，不仅需要另加材料和开发时间，还要求作为批准的新药申请的补充申请。

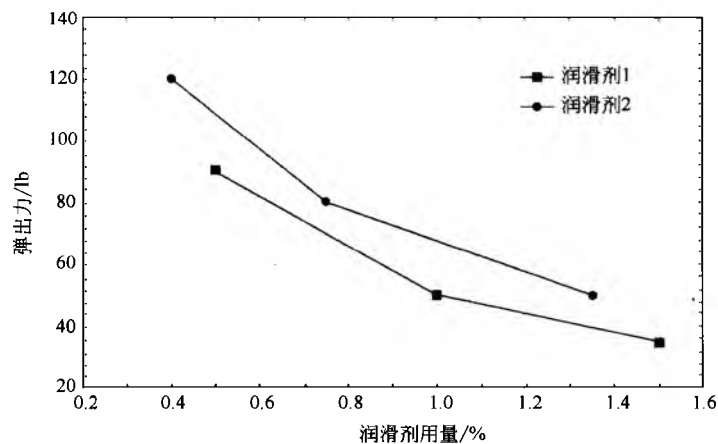


图 10 压力为 3000lb 时润滑剂用量与弹出力的关系曲线

10.5 响应表面图

配方和工艺的最优化可通过统计方法完成,借助于试验设计对最佳工艺参数、赋形剂和润滑剂用量作出判断。压片中的可控变量主要是预压压力、压片压力、压片机速度以及配方成分的用量。反应变量包括弹出力、片剂硬度和脆碎度、溶出速度和稳定性。试验设计的目的是进行一系列的试验来确定各种因素水平,使之达到最佳的因变量

$$z = 0.004138x + 0.000034xy - 0.000001x^2$$

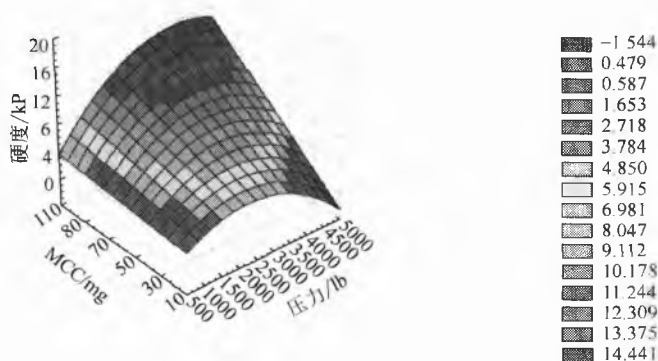


图 11 响应曲面图

10.6 可压性研究——弹性回复

许多粉末,尤其是具有黏弹性压缩机理的粉末,例如淀粉或微晶纤维素,具有很大的应力松弛性(随时间依赖性变形)。如对冲杆位移和压力进行监控,可对材料的可压性进行相当准确的评估。如上、下冲杆都装有 LVDT,可在不同的压制水平下测出片剂在冲模中的厚度。从图 12 中可看出,片剂厚度在压缩阶段迅速减小,然后在解压阶段有一定的厚度增加。这一厚度的增加程度反应了压力从片剂上撤去以后的弹性回复。

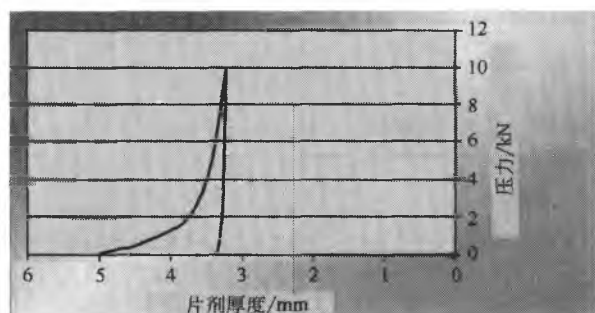


图 12 可压性研究——弹性回复

仪器化压片机可对弹性回复和压缩功进行深入的研究^[68]。

10.7 可压性研究——Heckel 曲线

1961 年 Heckel^[69,70]提出假设,在粉末的相对空隙度

水平。设计试验应花力气最少,而结果的统计可靠性最大。在这方面发表的论文大多数涉及响应曲面设计,它使得每个考察的反应变量都有对应的多项式方程。然后对多维表面进行探究,找出因变量的最佳范围;当将变量代入方程时能产生最佳的响应值。在图 11 曲线显示,当压缩力为 3000~4000lb、处方中有尽可能多的 MCC 时,得到最佳的硬度^[67]。

(密度的倒数)和施加压力之间存在一线性关系。线性回归的斜率即 Heckel 常数,它是一个随材料变化的参数,与平均屈服压力(受压缩的材料产生变形所要求的最小压力)成反比。Heckel 常数大,表示当片剂强度取决于原粉末颗粒大小时,在较小压力下易塑性变形。直线截距表示颗粒重排时的致密程度(图 13)。

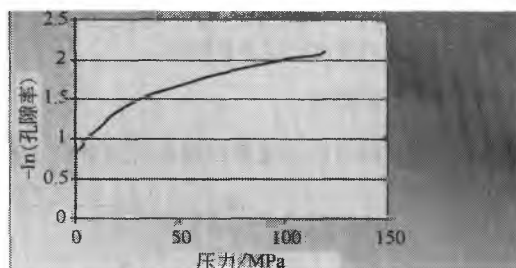


图 13 Heckel 曲线

用于发现并排除工艺故障的压片机仪器化

压片过程中经常会出现的问题有片重变化、顶裂、层裂、模具不规则、黏冲等,采用适当的仪表可发现或解决其中大部分问题。

1. 上部和下部压制

图 14 表示一组典型的片剂上部和下部压制曲线,可看

出下部的图形比上部小。在单工位压片机上,通常仅上冲杆活动,差别主要是由冲模内被压制的粉末摩擦引起的。

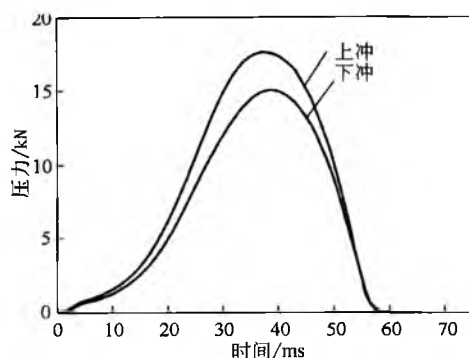


图 14 上下冲压力与时间关系

在旋转式压片机上,两个冲杆均运动。冲杆在旋转塔和冲模内的摩擦造成差别。下冲杆与旋转塔的匹配性比上冲杆大。另外,下冲杆一直不离开冲模,而上冲杆随每一行程离开和进入冲模。这就使得下冲杆对准较好,摩擦力较小。上冲杆匹配较紧,使其不能顺利进入冲模,导致摩擦力增加,这样,如两个峰值之间差别太大,就说明存在冲模润滑不良,或者冲杆对不直的问题。

2. 冲杆性能——柱状图

冲杆公差异常可在柱状图中更清楚地看出,每一柱表示每次冲压产生的峰值力(图 15),当新的一转到来时,柱的长度又被调整。如某柱一直比其他柱高或者低,说明冲杆太长或太短。

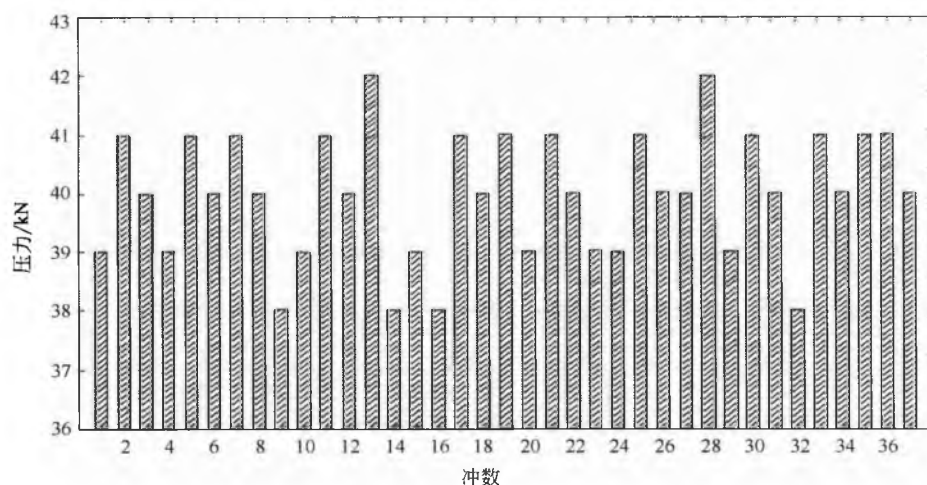


图 15 每冲压压力柱状图

3. 压片机监控——实时屏幕

在这一实时屏幕(图 16)中,可清楚地看到在第一工

位接近开关之后有一异常弹出动作。这清楚地说明存在黏冲或类似问题。另外,第一个压制峰值比其他高,可能是由于冲杆太长引起的。

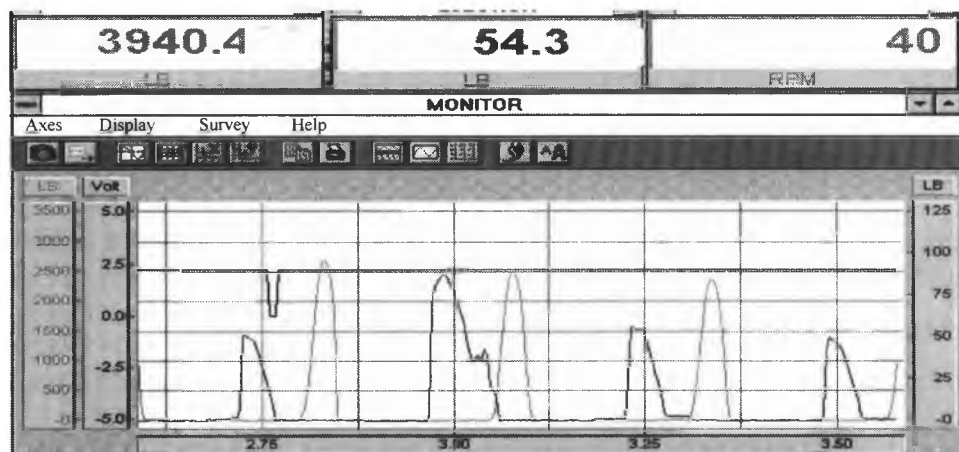


图 16 实时屏幕

用于工艺放大的压片机仪表化

1. 放样因素

配方员在研制和放大过程中碰到的一个主要实际问题是：某一配方能否承受施加在生产用压片机上高速的压力而不产生顶裂或层裂？通常对于这类问题的回答永远没有充分的把握，特别是当可用的材料很少，放大过程中的反复实验和失误可能造成代价昂贵的错误时^[71]。

当配方从小规模的研究用压片机移到高速机器上时，放大过程中可能出现的问题可在配方研制实验室中模拟生产条件来解决。一个消除潜在放大问题的途径是研制能对工艺条件非常稳定的配方。为此必须采用赋形剂详尽的数据库，该数据库详细列出了材料的性能。然而实际上，若无生产环境中试验手段的配合，生产条件的模拟是不能做到的。而且开始时药品数量较小，一些形式的模拟也是小规模进行的。在模拟压片机上进行的片剂工艺研究，是用来支持开发稳定的配方。模拟压片机很少用来模拟压片，原因如下：

从一台压片机向另一台压片机进行工艺转换时，力图保持片剂的机械性能（密度以及制备该片剂所用的能量）以及生物利用度（例如易受空隙度影响的溶出度）。但是，在单工位压片机或小型旋转式压片机上取得成功的一种配方可能会经受不起放大规模的挑战，因为在实验室或临床研究时符合所有质量标准要求的片剂，在高速时可能出现顶裂或层裂^[72,73]。

压片放样中最重要的变量是压力的大小和施加压力的速度。

1.1 压力因素

压力是片剂工艺中的主导因素，它直接关系到片剂的硬度和脆碎度，并与顶裂和层裂现象有关。

压力也被证明对崩解时间和溶出曲线有影响。

1.2 速度因素

随着冲压速度的提高，片剂的孔隙度和出现顶裂和层裂的趋势也增加。片剂的抗张强度随速度增加而趋于下降，尤其是对于塑性和黏弹性材料例如淀粉、乳糖、微晶纤维素、布洛芬、扑热息痛这类材料，在高速时有顶裂和层裂的倾向^[74~88]。

随后将详细讨论的停留时间和接触时间的概念，是压片机速度和作用力施加速率的常用指标。

1.3 作用力特征因素

除了压力大小和施加速率外，压力对时间关系的曲线形状也是至关重要的，因为它直接影响片剂的性能如硬度和脆碎度。已知的事实是压片周期的压制部分（压力-时间曲线的“上升时间”）这一因素，对造成顶裂和层裂的影响比

解压部分重要 6~15 倍。另一方面，减少压片周期中的解压部分，就减少了弹性回复程度，从而增加了片剂的硬度^[89]。如压片周期中的压制部分减少，对黏弹性材料来说不改变片剂的强度，但对脆性材料而言会增加片剂的硬度。

2. 其他考虑

其他许多因素会影响放大过程，如测量质量、模具的变化、粉末性能和片剂质量等。这些因素包括：

- 仪表等级；
- 速度测量；
- 机械强度测量；
- 模具变化；
- 粉末流变化；
- 赋形剂或原料变化；
- 片重变化。

3. 停留时间和接触时间

将研制用压片机速度同生产用压片机匹配当然是无意义的。因为工位数目和节圆直径不一样。所以重要的是把转速转换成停留时间或接触时间。

许多研究者报告了停留时间和应变率灵敏度对各种赋形剂压制的影响，特别是对黏弹性材料的影响^[90~94]。

目前对停留时间的定义有两种。

3.1 功能定义

从功能上讲，90%的有效停留时间（EDT）可定义为穿过压力-时间曲线上 90%峰值高度的时间。同样，有效接触时间（ECT）是指峰值高度 10%的点之间的时间。我们知道，压力-时间曲线的形状取决于粉末的变形机理。因此，当其他变量相同时，脆性材料和塑性材料的有效停留时间（EDT）和有效接触时间（ECT）是不同的。这些变量虽然对于表达材料特性时有一定用处，但不应与众所周知的接触时间和停留时间的定义相混淆。

3.2 机械定义

停留时间和接触时间的机械定义不考虑材料性能，而是针对压片机和冲杆的几何形状（图 17）。接触时间可定义为冲杆与压轮相接触的时间。停留时间为冲头平面与压缩轮接触的时间（最大冲杆位移时的时间或者冲杆在垂直方向不动的时间）。在停留时间的计算中，用到冲头平面的长度和冲杆速度的水平分量（由转速和节圆直径决定）。在采用圆头模具的情况下，停留时间按此定义为零。但应当理解，机械定义的停留时间是为比较不同压片机的速度而采用的一个约定的或共同的尺度，其绝对值并无意义。为了对压片机的线速度进行量化，有规定提出采用工业化制药技术（IPI）B 型模具作为压片机线速度比较的标准。这种 B 型模具具有一个已知的冲头平面。

下面我们将采用机械定义而不是功能定义，因为机械定义与材料无关，可客观地提供压片速度的测量值。

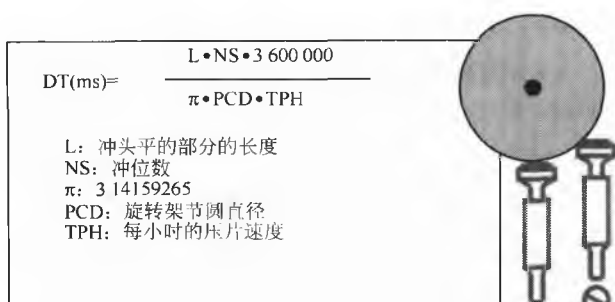


图 17 停留时间和接触时间——机械定义

3.3 不同压片机停留时间的比较

比较压片机的停留时间范围是一件有意义的事。可以看出，即使是同一个品牌的压片机，停留时间的分布范围也很广。需要注意的是，只有当时间范围重叠时才能进行按比例放大。停留时间范围也可以用于将压片设备分类或标识。不同的压片机，其停留时间范围相差很大。如图 18 所示，Manesty Betapress 按其生产速度属高速压片机。大概正是由于这一原因，这种压片机常用于研制工作。而小型压片机如 Korsch PH106 或 Piccola 的停留时间连 6~15ms 的基准生产速度 (benchmark production speeds) 也没达到。MCC Presster™ 压片机虽可达到生产停留时间，但一次仅生产一片。

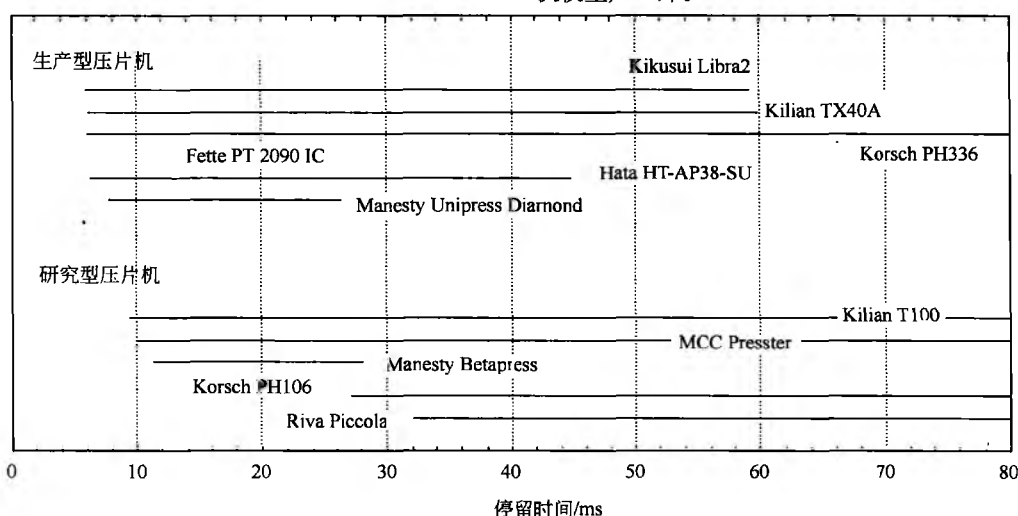


图 18 不同压片机的停留时间

3.4 停留时间与生产率的关系

对于每小时 100 000 片的基准生产速度 (图 19)，停留时间分布呈倒指数函数关系，这是预料中的，因为停留时间是压片机速度的反函数。一般来说，所有生产用压片机均应满足对每个基准产量停留时间和接触时间的要求。理想情况下，产品研发应在一台能够达到生产型产量 (指在停留时间方面) 的实验室压片机上进行。

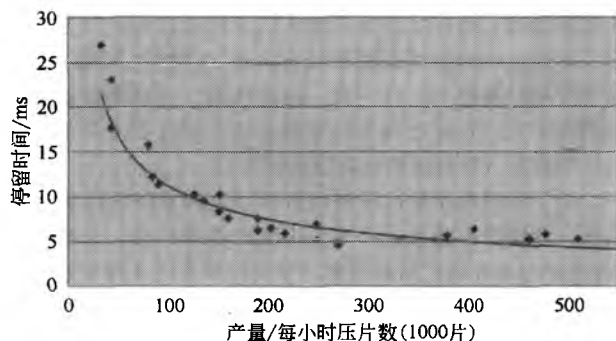


图 19 停留时间与生产速度的关系图

4. 压片工艺的因次分析

因次分析是产生能完整地表述工艺特性的无因次数的方法。它广泛应用于许多领域，包括化学工程和制药工业领域^[71]。由于在类似系统里用来描述工艺的无因次数必须有一样的数值^[95]，按不同规模使这些数值匹配，是保证工艺规模放大成功的一种可靠方法。采用进行测量的因次空间，可使工艺的规模保持不变。

在压片应用中，工艺的规模放大涉及到同一单位容积 (发生压制的冲模腔) 中不同的生产速度。这样，模型理论的条件之一 (同样的几何空间) 得到了满足。但任何工艺转化仍有运动学参数和动态参数需要研究和匹配。

科学的研究方法是利用因次分析的结果建立特定生产环境的模型，将几个重要因素，例如将无因次等值形式的压力和施加压力的速率 (冲杆速度和位移) 进行匹配，从而有助于压片工艺的规模放大^[96]。

压片机和压制模拟器

作为一般规律，片剂的配方研制速度要比生产速度慢

得多。如果要简化规模放大的工作量,需对生产用压片机进行模拟,这就需要找出一种加快压片工艺研制的方法。当获得冲杆的线速度时,压力的施加速率(即压片时瞬间的变化)也应与之匹配。当然,这是一个极其困难的任务。

1. 压制模拟器

世界上存在少数压制模拟器,这些模拟器在 20 多年前就已发明,目前,在基础压制研究方面逐渐开始流行。最近 20 年已出现大量有关它的研究文章^[97~117]。

压制模拟器(图 20)采用液压控制机构模拟任何规定形状的压缩周期,液压机构驱动一组冲杆(上冲杆和下冲杆)进出冲模。所有液压压制模拟器在设计上和结构上都相似。压制模拟器由以下几个主要部件组成:负载框架(立柱架和带冲杆的十字头)、液压组件(泵和移动十字头的传动部分)和控制部分(电子控制台和电脑)。通常情况下模拟器仅接受 F 模具,但经改装后可使用标准的 IPT B 模具。在电脑控制下液压传动装置使每个冲杆的负载、位置和应力保持稳定。

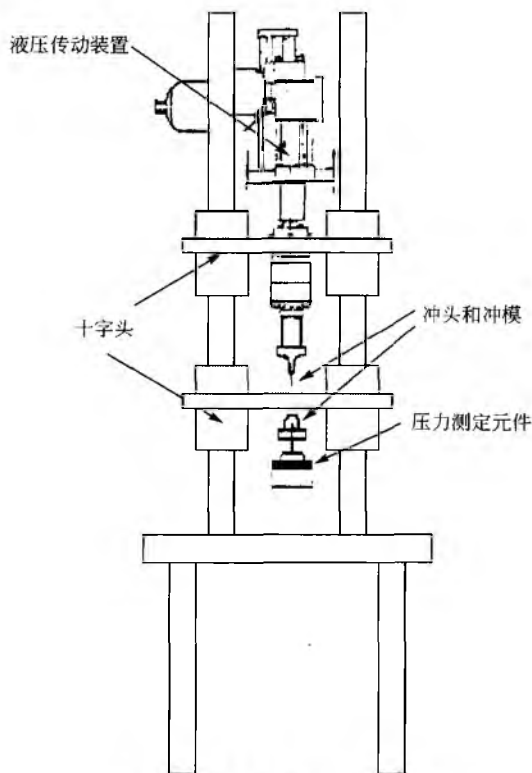


图 20 压制模拟器的示意图

模拟可通过下面两个程序之一实现:在任一给定的时间使冲杆的力匹配(负载控制)或冲杆的运动匹配(位置控制)。这样,当模拟器运作时,可选择模拟力的时间轨迹或选择冲杆的运动轨迹(冲杆位移曲线)。任何液压压制模拟器只能从两个程序选择一个进行模拟。

1.1 负载控制曲线

压片机模拟的主要目的是与生产用压片机的压力-时间相匹配,但是压力施加的速率和产生的信号形状事先并不知道。压制曲线(压力-时间曲线)理论上是计算不出来的,因为对不同的材料和模具,压制曲线的形状不同。

采用仪器化的冲杆来收集压力的数据很麻烦,因为仅限于使用特定尺寸和形状的冲杆。通过计算转换成压力值并不是总能合适。但可以通过一个经过校验的研发级的压力传感器对压力的波形进行监控和记录。生产用压片机的品牌、型号、速度、模具一旦确定以后,就可记录下压力的波形,然后输入到液压模拟器。

这一方法对配方研制工作不便于实施,因为必须采用与正在研制的配方相似的配方在一台旋转式压片机上记录压力波形。通常没有这样的粉末可供利用,而且在研制的实际配方的量也很少。

1.2 位置控制曲线

由于负载控制曲线不能实施,液压制模拟器的用户普遍倾向于采用冲杆位移曲线,他们期望当冲杆被迫与生产用压片机同样的方式运动时,力-时间曲线会相应生成。例如最近生产的一台实验室压制模拟器就根本没有力控制功能^[118]。

冲杆位置轨迹有三个可能的来源:

- (1) 预记录数据;
- (2) 人为曲线;
- (3) 理论曲线。

为了取得一台压片机的位置控制曲线,应使用 LVDT 记录冲杆的运动。除了技术方面的难度以外,冲杆在压片机上的运动取决于许多因素,包括压片机的品牌、型号、旋转架的速度、冲杆和冲模的形状、片剂的大小和形状,尤其重要的是粉末的可压性。这里的问题是生产用压片机的数据肯定不能用待研制的材料取得,这是一个难解之题;既想要在研制配方之前得到曲线,又想要在得到冲杆位移曲线之前拿到配方。

许多关于压制的研究采用人为的冲杆位移曲线在压制模拟器上进行,例如所谓的“单端”曲线,即下冲杆固定(与单冲压片机一样)。有的研究采用“锯齿”曲线,即一个恒速曲线,冲杆位移速度在负载下按给定的时间保持稳定。显然这样的曲线跟模拟没有关系,尽管它使基础压缩研究在某种程度上达成一致。行家认为“压制模拟器”一词用得恰当,应称之为压制研究系统,因它更适合于基础的压制研究(材料的稠化和黏合性能)。

为了模拟压片机,压制模拟器用户经常使用位置控制曲线,利用压轮的半径、冲头边缘的曲率半径、节圆半径(旋转架与冲杆轴之间的距离)和旋转架角速度等压片机和冲杆的几何数据计算出理论轨迹^[119]。

用产生的正弦方程来“模拟”压片机上冲杆的运动。

实际上,旋转式压片机冲杆位移的理论曲线和实际曲

线大相径庭,因为理论曲线不能解释某些机械因素如冲杆头平面等。另外,冲杆运动方程是根据冲杆进入一个空的冲模得出的,方程中未考虑材料对压缩的反抗力和弹性回复的影响。计算的冲杆运动和实际的冲杆运动之间的差异相当惊人^[120~122]。再次,经证明上下冲杆运动可能不同步。最大力在时间上也与冲杆间最小距离不相吻合^[123]。所有这些(压片机变形、接触时间等)问题,都使得在液压压制模拟器上模拟一台生产用压片机行不通。引用 Muller 和 Augsbury^[124]论文中说的,“尽管设计压制模拟器用于模拟压片机的位移时间性能,但实际上很少能派上这一用场”。

报道采用压制模拟器模拟实际压片机的文献很少。有些论文认为,不管出于何种原因,用 Manesty Betapress 压片机生产的片剂,比用 Betapress 冲杆理论位移曲线在一台压缩模拟器上生产的片剂硬度明显要低^[120,125]。

总之,可以说液压压制模拟器适用于基础压制研究,但对于模拟生产用压片机并不实用。

2. 压片机复制器 “Presster™”

最近推出了一种小规模模拟生产用压片机的新型机器。品牌为 Presster,含“压片机”和“试验”之意,可归为机械压制模拟器一类。

Presster™是一台高速单工位压片机,同时也是一台压片机模拟器(图 21)。它被用来模拟生产用压片机,不采用液压控制,故不需要输入人为的、理论的或预录制的冲杆位移曲线。它由一个直线形车架组成,车架带动一组冲杆和一个冲模,在两个压轮之间运动。它可配上合适的压轮以模拟压片机几何形状,用变速马达驱动以匹配压片机转速,调节压轮之间的距离和充填深度以匹配片剂质量和厚度,安装标准的工业化制药技术(IPT)或任何特别模具以匹配模具要求。

这样,利用机械的相似性实现规模放大,即压力、速度、压力曲线的形状都与生产上的数据相吻合。使用复制器时先选定一台要模拟的生产用压片机,并安装带有匹配直径的压轮。然后选定生产速度即每小时片数、转速或停留时间。Presster™复制器将模拟选定的压片机速度和压力图形,能够一片一片地生产片剂。



图 21 压片机复制器 Presster™

机械压制模拟器作为高速单工位压片机能够绘出可压性曲线和 Heckel 图表,计算压缩功以及其他能想到的有利于处方设计的变量。用 Betapress 压片机和用 Presster 复制器制备的片剂具有相似的抗张强度^[126]。

压片周期中的预压和弹出工序也可加入模拟。复制器目前尚有以下一些局限:不能遵从人工的冲杆运动曲线,至少在目前的配置中未说明在高速状态加料和冲模冲填以及跟速度有关的温度波动问题。

生产车间的压片机仪器化和控制

1. 片重控制和压力控制

为保证片重在允许的公差范围内,所需的测量装置包括压缩传感器和若干个接近开关,用于识别工位和定位压片动作。片重控制器只是压片机自动控制系统中一个重要部件,压片机自动控制系统包括:

- (1) 片重控制;
- (2) 材料输送装置;
- (3) 加料系统;
- (4) 收集系统;
- (5) 包装系统;
- (6) 监控台(SCADA)。

上述最后一项可以是一台置于监控员桌上的电脑,它监控生产车间里每一台压片机,及时提供每一批产品的状态报告。

片重差异的控制是必不可少的,理由是:

- (1) 因损耗少,生产成本降低
- (2) 设备利用率高,生产率提高
- (3) 批之间的变化最小,理由显而易见

当不合格的报废片剂成本较高时,采用质量控制达到的节省相当可观。不合格片剂混入合格批次的机会减少,产品质量得到提高。最后安全性也有改进,因为自动化程序需要的人工操作较少。

1.1 控制机理

在片剂厚度不变时,在目标片重变化很小的范围内,压力同片重成正比。压力控制系统通过调节充填凸轮的深度将压力保持在规定的范围内,这一范围是对每种配方根据经验确定的。

质量控制系统也可以要求压力和片剂质量之间建立相关性。可在不同的压力下制备一些片剂,以确定压力与片重的关系。其次,可用压力来表示片重公差范围。质量控制系统能够调节剂量,使片重保持在所需的范围内。为了使这一控制理论前后一致地工作,需定期校验压力-质量关系曲线,因为粉末的性质和片剂的机械状态会随时间发生变化。

控制功能包括警告和停机(当某一压力峰值或转一圈的平均值超过设定的范围时)、压力或质量控制(一般按转一圈的平均值)以及不合格片剂的剔除。采用机械门一般一次剔除几个片剂,连同不合格片剂旁边的几个合格片剂一起剔除。采用快速气动剔除装置,控制系统可定位并仅剔除不合格片剂。

1.2 控制标准

控制决定一般在以下情况下作出：

- 转一圈的平均值超过重新确定的范围，调节充填凸轮的深度。
- 剔除出的片剂超出具体范围，或者压片机速度低于一定水平。
- 同一工位重复产生废片，或者转一圈的平均值超出警告极限时发出警报。
- 压力超过停机极限，或者转一圈的平均值超过停机极限时压片机停机。

1.3 控制算法

当压力偏离设定的目标水平，需对计量凸轮采取修正措施，此控制方法称为单点式控制。修正措施可以与偏离值成正比（P），或者与偏离值在一段时间内的积分（I）相关，还可以用压力的变化率（D，微分）来表示。这三种情况分别对应于比例型（P）、积分型（I）和微分型（D）控制。控制类型还可以有不同组合，例如可以有 P、I、P+I、P+D、P+I+D 等不同控制算法。

当压力在公差上限和下限规定的可接受范围之外时，可采用两点式控制。这样就有单独的控制限度、剔除限度、警告限度、停机限度，当信号在限度内时不需要采取行动。

严格地说，单点式控制可看作两点式控制当控制限度的范围变窄到接近零时的一种特殊情况。

2. 控制系统

2.1 原设备制造商（OEM）控制系统

几乎所有的压片机制造商都提供压片机控制系统。有

些系统非常复杂，它监测和控制大量的压片功能。虽然在生产车间可能有几种品牌的压片机，但不同制造商的控制系统实施并没有统一的标准。同样，软件接口的用户友好性也大不相同。

在一种品牌的压片机上，通过调节计量凸轮改变预压时粉末的厚度来控制片剂质量。预压力巧妙地由气动补偿机构保持相对稳定。在这种情况下，片重与厚度成正比。随后的压制周期可以与在其他压片机上一样按恒定厚度进行。

2.2 通用的控制系统

除 OEM 控制系统以外的另一种选择是通用控制器，它提供了与品牌控制器兼容的控制设备，具有一定程度的标准化。

但是这类通用控制器可能欠缺压片机制造商生产的控制器所具有的灵敏度和多功能性。须注意的是并不是所有的控制系统出厂时都相同，但它们都采用同样的原理。

一台合格的片重控制系统应能依据产品配方，按要求显示即时压力分布、控制图表和批次报告并将数据存档用于以后的分析和文件编制，给出一定程度的标准化的测量，完全符合当前的验证要求，并提供多级安全保护，（如当需要改变配方时操作员和监控员的口令保护）。下面介绍带有控制器的生产型仪器化压片机中操作员可读取显示的几个例子。

2.3 配方示例

图 22 是一个典型的控制配方示例，带有计量凸轮调节、剔除、警告、停机以及以偏离目标片重百分率表示。所有数值通过软件转换成相应的压力水平以便用于控制目的。

Recipe File PLACEBO	
Recipe Name	Placebo
Product Number	Product No. 1234567
Tooling	16" flat face IPT B Tooling
Tablet Weight	
Target, mg	300
Control Limits, %	3.3 From 290.1 mg to 309.9 mg
Rejection Limits, %	3.3 From 290.1 mg to 309.9 mg
Alarm Limits, %	4 From 288.0 mg to 312.0 mg
Shutdown Limits, %	5 From 285.0 mg to 315.0 mg
Target Tablet Thickness, mm	5.5
Target Tablet Hardness, N	100
Target Press Speed, RPM	40
Target Batch Size, tablets	1,000,000
Target Batch Size, kg	300.0
Recipe File Name: PLACEBO	
Last Modification Date: Tuesday, May 18, 1999	
Comments	
OPERATOR: Herbert Herrera	

图 22 配方示例

2.4 柱状图

这一图表与用于压片机故障排除的每冲压力图相似(图 15)。它对于生产用压片机操作员来说是很重要的。

2.5 控制图

控制图是一个简单的峰值压力与时间关系图。图表上的每一点对应于所压制的片剂数 N 的平均值 (N 从 1 到几转)。水平直线表示控制限。

2.6 过程控制统计图

平均值的过程控制统计图 (SPC, 见图 23) 是另一个“必备”的实时显示。图上每一点表示转一圈的压力平均值或者相应的片剂质量。限度线是按照平均值的标准差计算的。确定过程是否或什么时候失去控制有一定的规则可遵循, 这些规则在过程控制统计教科书中都可得到。

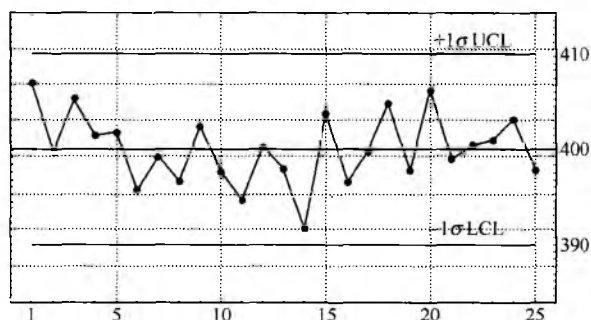


图 23 过程控制统计图

参考文献

- Higuchi, T.; Nelson, E.; Busse, L. W. The Physics of Tablet Compaction 3: Design and Construction of an Instrumented Tableting Machine. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1954, 43 (6), 344—348.
- Nelson, E.; Naqvi, S. M.; Busse, L. W.; Higuchi, T. The Physics of Tablet Compression IV: Relationship of Ejection, and Upper and Lower Punch Forces During Compressional Process. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1954, XLIII (10), 596—602.
- Nelson, E. The Physics of Tablet Compression VIII: Some Preliminary Measurements of Die Wall Pressure During Tablet Compression. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1955, 44, 494—497.
- Knoechel, E. L.; Ross, H. E.; Sperry, C. C. Measurement of Force Within a Tableting Machine. US Patent 3 255 716, 1966.
- Knoechel, E. L.; Sperry, C. C.; Ross, H. E. Instrumented Rotary Tablet Machines 1: Design, Construction, and Performance as Pharmaceutical Research and Development Tools. *J. Pharm. Sci.* 1967, 56 (1), 109—115.
- Knoechel, E. L.; Sperry, C. C.; Lintner, C. J. Instrumented Rotary Tablet Machines 2: Evaluation and Typical Applications in Pharmaceutical Research Development and Production Studies. *J. Pharm. Sci.* 1967, 56 (1), 116—130.
- Holm, J. P., Arming Control for Servo-Adjusted Tablet Compression Machines. US Patent 3, 734, 663, 1973.
- Hooker, D. B. Potted Strain Gage. US Patent 3 791 205, 1974.
- Williams, J. J. Applied Instrumentation Providing Tableting Compression Force. US Patent 4, 016, 744, 1977.
- Williams, J. J. Force Measurement and Analysis Particularly Relating to Rotary Tablet Presses. US Patent 4 030 868, 1977.
- Stiel, D. M.; Browski, C. R.; Neugroschel, E.; Williams, J. J. Tablet Press Related Instrumentation for Use in Development and Control of Formulations of Pharmaceutical Granulations. US Patent 4 100 598, 1978.
- Williams, J. J. Force Measurement and Analysis Particularly Relating to Rotary Tablet Presses. US Patent 4 099 239, 1978.
- Stiel, D. M. Method Invoking Tableting Compression Force Control for Optimizing Tableted Formulation Parameters. US Patent 4 121 289, 1978.
- Breen, D. T., et al. Tablet Press Controller and Method. US Patent 4 570 229, 1986.
- Lewis, D. A., Pharmaceutical Tablet Press Control Mechanism. US Patent 4 817 006, 1989.
- Shotton, E.; Deer, J. J.; Ganderton, D. The Instrumentation of a Rotary Tablet Machine. *J. Pharm. Pharmacol.* 1963, 5, 106T—114T.
- Lammens, R. F.; Liem, T. B.; Polderman, J.; de Blayey, C. J. Evaluation of Force - Displacement Measurements During Powder Compaction. Part 1: Precision and Accuracy of Force Measurements. *Int. J. Pharm.* 1980, 1 (3), 26—35.
- Walter, J. T.; Augsburger, L. A Computerized Force - Displacement Instrumentation System for a Rotary Press. *Pharm. Tech.* 1986, 10 (2), 26—33.
- Jerzewski, R. L.; Rudnic, E. M. The Development of a Low-Cost Intelligent Tablet Compression Monitor Using a Personal Computer. *Pharm. Tech.* 1986, September, 32—41.
- Zeiss, J. C.; Beck, B.; Patel, K. Development of a Monitoring System for an Instrumented Rotary Tablet Press. *Pharm. Tech.* 1986, August, 60—67.
- Hunter, B. M.; Fisher, D. G.; Pratt, R. M.; Rowe,



- R. C. A High Speed Compression Simulator. *J. Pharm. Pharmacol.* 1976, 28S, 65P.
22. Pento, T. Procedure for Simulating Tablet Compression. US Patent 5, 517, 871, 1996.
23. Levin, M.; Tsygan, L.; Dukler, S. Press Simulation Apparatus. US Patent 6, 106, 262, 2000.
24. Schwartz, J. B. The Instrumented Tablet Press: Uses in Research and Production. *Pharm. Tech.* 1981, 9, 102-132.
25. Marshall, K. Instrumentation of Tablet and Capsule Filling Machines. *Pharm. Tech.* 1983, March, 68-82.
26. Jones, T. M.; Ho, A. Y. K.; Barker, J. F. The Use of Instrumentation in Tablet Research, Development and Production. *Pharm. Tech.* 1985, March, 42-47.
27. Çelik, M.; Ruegger, C. E. An Overview of Tableting Technology, Part I: Tablet Presses and Instrumentation. *Pharm. Tech. Suppl.—TabGran Yearbook* 1996, 20-39.
28. Ridgeway Watt, P. Tablet Machine Instrumentation in Pharmaceuticals: Principles and Practice; Ellis Horwood Ltd.; Chichester, UK, 1988.
29. Muñoz-Ruiz, A.; Vromans, H. Data Acquisition and Measurement Techniques; Interpharm Press; Buffalo Grove, IL, 1998.
30. Vezin, W. R.; Pang, H. M.; Khan, K. A.; Malkowska, S. The Effect of Precompression in a Rotary Machine on Tablet Strength. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1983, 9 (8), 1465-1474.
31. Vezin, W. R.; Khan, K. A.; Pang, H. M. Adjustment of Precompression Force to Reduce Mixing-Time Dependence of Tablet Tensile Strength. *J. Pharm. Pharmacol.* 1983, 35, 555-558.
32. Mitrevej, A.; Augsburger, L. L. Adhesion of Tablets in a Rotary Tablet Press. I. Instrumentation and Preliminary Study of Variables Affecting Adhesion. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1980, 6 (4), 331-337.
33. Mitrevej, A.; Augsburger, L. L. Adhesion of Tablets in a Rotary Tablet Press. II. Effects of Blending Time, Running Time, and Lubricant Concentration. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1982, 8 (2), 237-282.
34. Goodhart, F. W.; Mayorga, G.; Ninger, F. C. Measurement of Lower Punch Pulldown Force and Its Significance. *J. Pharm. Sci.* 1969, 58 (2), 248-251.
35. Hoblitzell, J. R.; Rhodes, C. T. Determination of a Relationship Between Force - Displacement and Force - Time Compression Curves. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1990, 16, 201-229.
36. Ragnarsson, G.; Sjogren, J. Force - Displacement Measurements in Tableting. *J. Pharm. Pharmacol.* 1984, 37, 145-150.
37. Von Schmidt, P. C.; Tenter, U. Displacement Measurements of Rotary Presses. *Pharm. Ind.* 1985, 426-430.
38. Walter, J. T.; Augsburger, L. A Computerized Force - Displacement Instrumentation System for a Rotary Press. *Pharm. Tech.* 1986, 9, 26-43.
39. Nelson, E. The Physics of Tablet Compression VIII: Some Preliminary Measurements of Die Wall Pressure During Tablet Compression. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1955, 44, 494-497.
40. Long, W. M. Radial Pressures in Powder Compaction. *Powder Met.* 1960, 6, 73-86.
41. Windheuser, J. J.; Misra, J.; Eriksen, S. P.; Higuchi, T. The Physics of Tablet Compression. 13. Development of Die Wall Pressure During Compression of Various materials. *J. Pharm. Sci.* 1963, 52, 767-772.
42. Carless, J. E.; Leigh, S. Compression Characteristics of Powders; Radial Die Wall Pressure Transmission and Density Changes. *J. Pharm. Pharmacol.* 1974, 26, 289-297.
43. Carstensen, J. T.; Toure, P. Correlation Between Hysteresis Loop Areas of Lower Punch and of Die Pressures Versus Upper Punch Pressures. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1981, 7 (5), 645-648.
44. Schrank-Junghani, H.; Bier, H. P.; Sucker, H. The Measurement of Die Wall Forces to Determine the Minimum Concentration of Lubricant Needed for Tablet Formulations. *Acta Pharm. Technol.* 1984, 30 (3), 224-234.
45. Cocolas, H. G.; Lordi, N. G. Axial to Radial Pressure Transmission of Tablet Excipient Using a Novel Instrumented Die. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1993, 19, 2473-2497.
46. Hoag, S.; Renuka, N.; Muller, F. Force-Transducer Design Optimization for the Measurement of Die-Wall Stress in a Compaction Simulator. *Pharm. Pharmacol. Commun.* 2000, 6, 293-298.
47. Nurnberg, E.; Hopp, A. Temperature Measurement During Tableting. *Pharm. Technol.* 1981, 9, 81-101.
48. Travers, D. N.; Merriman, M. P. H. Temperature Changes Occurring During the Compression and the Recompression of Solids. *J. Pharm. Pharmacol.* 1970, 22S, 11S-16S.
49. Ilkka, J. Instrumentation of Rotary Tablet Machine by a Portable Measuring System. In *Data Acquisition and Measurement Techniques*; Muñoz-Ruiz, A., Vromans, H., Eds.; Interpharm Press; Buffalo Grove, IL, 1998.
50. Matz, C.; Bauer-Brandl, A.; Rigassi, T.; Schubert, R.; Becker, D. On the Accuracy of a New Displacement In-

- strumentation for Rotary Tablet Presses. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1999, 25 (2), 117–130.
51. Barra, J.; Doelker, E. Instrumentation of an Eccentric Tablet Press. In *Data Acquisition and Measurement Techniques*; Muñoz-Ruiz, A., Vromans, H., Eds.; Interpharm Press; Buffalo Grove, IL, 1998.
 52. Hoblitzell, J. R.; Rhodes, C. T. Recent Developments in the Use of Instrumented Tablet Presses. *Pharm. Int.* 1985, 6, 45–50.
 53. Hoblitzell, J. R.; Rhodes, C. T. Preliminary Investigations on the Parity of Tablet Compression Data Obtained from Different Instrumented Tablet Presses. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1986, 12, 507–525.
 54. Marshall, K. Monitoring Punch Forces and Punch Movements as an Aid to Developing Robust Tablet Formulations. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1989, 15 (13), 2153–2176.
 55. Martinez-Pacheco, R.; Vila-Jato, J. L.; Souto, C. Prediction of Tablet Properties by Compression Force - Time Profile Parameters. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1990, 16 (2), 231–241.
 56. Hoblitzell, J. R.; Rhodes, C. T. Instrumented Tablet Press Studies on the Effect of Some Formulation and Processing Variables. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1990, 16 (3), 469–507.
 57. Martinez-Pacheco, R.; Vila-Jato, J. L.; Souto, C. The Effect of Maximum Compression Force and Drug Content on Compression Force - Time Profile Parameters. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1990, 16 (2), 243–254.
 58. Obiorah, B. A. Possible Prediction of Compression Characteristics from Pressure Cycle Plots. *Int. J. Pharm.* 1978, 1, 249 - 255.
 59. Pitt, K. G.; Newton, J. M.; Stanley, P. Effects of Compaction Variables on Porosity and Material Tensile Strength of Convex-Faced Aspirin Tablets. *J. Pharm. Pharmacol.* 1990, 42, 219–225.
 60. Oates, R. J.; Mitchell, A. G. A New Method of Estimating Volume During Powder Compaction and the Work of Compaction on a Rotary Tablet Press from Measurements of Applied Vertical Force. *J. Pharm. Pharmacol.* 1993, 46, 270–275.
 61. Oates, R. J.; Mitchell, A. G. Calculation of Punch Displacement and Work of Compaction on a Rotary Tablet Press. *J. Pharm. Pharmacol.* 1989, 41, 517–523.
 62. Ragnarsson, G.; Sjogren, J. Work of Friction and Net-Work During Compaction. *J. Pharm. Pharmacol.* 1983, 35, 201–204.
 63. Vogel, P. J.; Schmidt, P. C. Force - Time Curves of a Modern Rotary Tablet Machine. II. Influence of Compression Force and Tableting Speed on the Deformation Mechanisms of Pharmaceutical Substances. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1993, 19, 1917.
 64. Juppo, A. M.; Kervinen, L.; Yliruusi, J. Skewness and Kurtosis of Force - Time Profile Obtained from Compression of Lactose, Glucose and Mannitol Granules. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1995, 41 (6), 374–381.
 65. Ho, A. Y. K.; Jones, T. M. Punch Travel Beyond Peak Force During Tablet Compression. *J. Pharm. Pharmacol.* 1988, 40, 75P.
 66. Akande, O. F.; Ford, J. L.; Rowe, P. H.; Rubinstein, M. H.; The Effects of Lag-Time and Dwell-Time on the Compaction Properties of 1: 1 Paracetamol/ Microcrystalline Cellulose Tablets Prepared by Pre-compression and Main Compression. *J. Pharm. Pharmacol.* 1998, 50, 19–28.
 67. Down, G. R. B.; Miller, R. A.; Chopra, S. K. Use of a Desk-Top Computer in a Search-Type Optimization of Tablet Formulations. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1987, 38, 23–31.
 68. Dwivedi, S. K.; Oates, R. J.; Mitchell, A. G. Estimation of Elastic Recovery, Work of Decompression and Young Modulus Using a Rotary Tablet Press. *J. Pharm. Pharmacol.* 1992, 44, 459–466.
 69. Heckel, R. W. An Analysis of Powder Compaction Phenomena. *Trans. Metall. Soc.* 1961, 221, 1001–1008.
 70. Heckel, R. W. Density - Pressure Relationships in Powder Compaction. *Trans. Metall. Soc.* 1961, 221, 671–675.
 71. Levin, M., Ed. *Pharmaceutical Process Scale-Up*; Marcel Dekker; New York, 2002.
 72. Schwartz, J. B. Scale-Up of the Compaction and Tableting Process. In *Pharmaceutical Process Scale-Up*; Levin, M., Ed.; Marcel Dekker; New York, 2002.
 73. Strathy, W.; Gomez, A. Practical Aspects of Tableting Scale-Up. In *Pharmaceutical Process Scale-Up*; Levin, M., Ed.; Marcel Dekker; New York, 2002.
 74. Bateman, S. D.; Rubinstein, M. H.; Thacker, H. S. Properties of Paracetamol Tablets Produced Using High Precompression Pressures. *J. Pharm. Pharmacol.* 1989, 41S, 32P.
 75. Bateman, S. D.; Rubinstein, M. H.; Wright, P. The Effect of Compression Speed on the Properties of Ibuprofen Tablets. *J. Pharm. Pharmacol.* 1987, 39, 66P.
 76. Cook, G. P.; Summers, M. P. Effect of Compression Speed on Tensile Strength of Tablets of Binary Mixtures Containing Aspirin. *J. Pharm. Pharmacol.* 1990, 42, 462–467.
 77. Danjo, K.; Kimura, H.; Otsuka, A. Influence of Punch

- Velocity on the Compressibility of Granules. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1996, 22 (9&10), 933—942.
78. Fell, J. T.; Newton, J. M. Effect of Particle Size and Speed of Compaction on Density Changes in Tablets of Crystalline and Spray-Dried Lactose. *J. Pharm. Sci.* 1971, 60, 1866—1869.
79. Garr, J. S. M.; Rubinstein, M. H. An Investigation into the Capping of Paracetamol at Increasing Speeds of Compression. *Int. J. Pharm.* 1991, 72, 117—122.
80. Garr, J. S. M.; Rubinstein, M. H. The Effect of Rate of Force Application on the Properties of Microcrystalline Cellulose and Dibasic Calcium Phosphate Mixtures. *Int. J. Pharm.* 1991, 73, 75—80.
81. Holman, L. E.; Leuenberger, H. Effect of Compression Speed on the Relationship Between Normalized Solid Fraction and Mechanical Properties of Compacts. *Int. J. Pharm.* 1989, 57, R1—R5.
82. Marshall, P. V.; York, P.; MacLaine, J. Q. An Investigation of the Effect of the Punch Velocity on the Compaction Properties of Ibuprofen. *Powder Technol.* 1993, 74, 171—177.
83. Marshall, P. V.; York, P.; Richardson, R. The Effect of Duration of Compression on the Axial Recovery Properties of Compacts of a Crystalline Drug Substance. *J. Pharm. Pharmacol.* 1986, 38, 47P.
84. Monedero, M.; Jimenez-Castellanos, M. R.; Velasco, M. V.; Muñoz-Ruiz, A. Effect of Compression Speed and Pressure on the Physical Characteristics of Maltodextrin Tablets. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1998, 24 (7), 613—621.
85. Rees, J. E.; Rue, P. J. Time-Dependent Deformation of Some Direct Compression Excipients. *J. Pharm. Pharmacol.* 1978, 30, 601—607.
86. Ritter, A.; Sucker, H. B. Studies of Variables That Affect Tablet Capping. *Pharm. Tech.* 1980, March, 57—62.
87. Roberts, R. J.; Rowe, R. C. The Effect of Punch Velocity on the Compaction of a Variety of Materials. *J. Pharm. Pharmacol.* 1985, 37, 377—384.
88. Roberts, R. J.; Rowe, R. C. The Effect of Relationship Between Punch Velocity and Particle Size on the Compaction Behaviour of Materials with Varying Deformation Mechanisms. *J. Pharm. Pharmacol.* 1986, 38, 567—571.
89. Yliruusi, J. K.; Antikainen, O. New Parameters Derived from Tablet Compression Curves. Part I. Force - Time Curve. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1997, 23 (1), 69—79.
90. Armstrong, N. A. Time-Dependent Factors Involved in Powder Compression and Tablet Manufacture. *Int. J. Pharm.* 1989, 49, 1—13.
91. Armstrong, N. A.; Blundell, L. P. The Effect of Machine Speed on the Compaction of Some Directly Compressible Tablet Diluents. *Pharmacology.* 1985, 37, 28P.
92. Armstrong, N. A. Considerations of Compression Speed in Tablet Manufacture. *Pharm. Tech.* 1990, 9, 106—116.
93. Muñoz-Ruiz, A., et al. Theoretical Estimation of Dwell and Consolidation Times in Rotary Tablet Machines. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1992, 18 (9), 2011—2028.
94. Akande, O. F.; Ford, J. L.; Rubinstein, M. H. Effect of Dwell Times on the Pre-and Main Compression of a 1:1 Paracetamol: Microcrystalline Cellulose. *J. Pharm. Pharmacol.* 1995, 47, 1102.
95. Zlokarnik, M. Dimensional Analysis and Scale-Up in Chemical Engineering, Springer-Verlag: Berlin, 1991.
96. Levin, M.; Zlokarnik, M. Dimensional Analysis of the Tableting Process. In *Pharmaceutical Process Scale-Up*, Levin, M., Ed.; Marcel Dekker: New York, 2002.
97. Mann, S. C.; Roberts, R. J.; Rowe, R. C.; Hunter, B. M. The Influence of Precompression Pressure on Capping. *J. Pharm. Pharmacol.* 1982, 34, 49P.
98. Mann, S. C.; Roberts, R. J.; Rowe, R. C.; Hunter, B. M.; Rees, J. E. The Effect of High Speed Compression at Subatmospheric Pressure on the Capping Tendency of Pharmaceutical Tablets. *J. Pharm. Pharmacol.* 1983, 35, 44P.
99. Yang, L.; Venkatesh, G.; Fassihi, R. Characterization of Compactibility and Compressibility of Poly (Ethylene Oxide) Polymers for Modified Release Application by Compaction Simulator. *J. Pharm. Sci.* 1985, 85, 1085—1090.
100. Bateman, S. D. A Comparative Investigation of Compression Simulators. *Int. J. Pharm.* 1989, 49, 209—212.
101. Bateman, S. D. High Speed Compression Simulators in Tableting Research. *Pharm. J.* 1988, 240, 632—633.
102. Bateman, S. D.; Rubinstein, M. H.; Rowe, R. C.; Roberts, R. J.; Drew, P.; Ho, A. Y. K. A Comparative Investigation of Compression Simulators. *Int. J. Pharm.* 1989, 49, 209—212.
103. Çelik, M.; Marshall, K. Use of a Compaction Simulator System in Tableting Research. Part 1; Introduction to and Initial Experiments with the System. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1989, 15 (5), 759—800.
104. Çelik, M.; Lordi, N. G. The Pharmaceutical Compaction Research Laboratory and Information Center. *Pharm. Tech.* 1991, 3, 112—116.



105. Rubinstein, M. H. Compaction Properties of a Cellulose-Lactose Direct-Compression Excipient. *Pharm. Tech.* 1991, 4, 76—80.
106. Rubinstein, M. H. Applications of Compaction Simulators. *Pharm. Manuf. Int.* 1992, 177—182.
107. Çelik, M.; Driscoll, C. E. An Overview of the Effects of Some Physico-Chemical and Mechanical Characteristics of Particulates on the Compaction and Post-compaction Properties of Compacts. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1993, 19, 2119—2141.
108. Çelik, M.; Ong, J. T. H.; Chowhan, Z. T.; Samuel, G. J. Compaction Simulator Studies of a New Drug Substance; Effect of Particle Size and Shape, and Its Binary Mixtures with Microcrystalline Cellulose. *Pharm. Dev. Tech.* 1996, 1, 119—126.
109. CSUG. Compaction Simulator Users Group Meeting—Standards. <http://www.bath.ac.uk/> (accessed March 23, 1996).
110. CSUG. Compaction Simulator Users Group Meeting—Standards. <http://www.bath.ac.uk/> (accessed July 3, 1996).
111. CSUG. Minutes of the Compaction Simulator Users Group. <http://www.bath.ac.uk/> (accessed October 2, 1996).
112. Asgharnejad, M.; Storey, D. Application of a Compaction Simulator to the Design of a High-Dose Tablet Formulation. Part I. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1996, 22 (9&10), 967—975.
113. Nokhodchi, A.; Rubinstein, M. H. Compaction Simulators in Tableting Research. *Pharm. Tech. Suppl. — TabGran Yearbook* 1996, 6, 18.
114. Razaghi, A. M.; Venkatesh, G.; Fassihi, R., Consolidation and Compaction Behavior of Sorbitol in Pharmaceutical Technology: A Compaction Simulator Study. AAPS Meeting, November 1997.
115. Yang, L.; Venkatesh, G.; Fassihi, R. Compaction Simulator Study of a Novel Triple-Layer Tablet Matrix for Industrial Tableting. *Int. J. Pharm.* 1997, 152, 45—52.
116. Barnett, M. E.; Muller, F. X.; Venkatesh, G. M., Characterization of the Tableting Properties of Four Drug Substances Using a Compaction Simulator and Hiestand Indices of Tableting Performance. AAPS Meeting, November 1998.
117. Kim, H.; Venkatesh, G.; Fassihi, R. Compactibility Characterization of Granular Pectin for Tableting Operation Using a Compaction Simulator. *Int. J. Pharm.* 1998, 161, 149—159.
118. Carlson, G. T.; Christie, H. R.; Curtiss, A. C.; Hausberger, A. G.; Jarvas, R. E.; Jaxheimer, B. A.; Schelhom, J. J.; Sinko, C. M. Design, Fabrication and Start-Up of a Laboratory Scale Compaction Simulator. AAPS Meeting, November 1998.
119. Rippie, E. G.; Danielson, D. W. Viscoelastic Stress/Strain Behavior of Pharmaceutical Tablets; Analysis During Unloading and Postcompression Periods. *J. Pharm. Sci.* 1981, 70, 476—482.
120. Ruegger, C. D. An Investigation of the Effect of Compaction Profiles on the Tableting Properties of Pharmaceutical Materials. Ph. D. Thesis, 1996.
121. Oates, R. J.; Mitchell, A. G. Comparison of Calculated and Experimentally Determined Punch Displacement on a Rotary Tablet Press Using Both Manesty and IPT Punches. *J. Pharm. Pharmacol.* 1990, 42, 388—396.
122. Pedersen, M. A.; Rubinstein, M. H.; Bateman, S. D. Measuring Punch - Time Displacement Profiles on a Rotary Tableting Machine Using a High-Speed Video System. *Pharm. Tech.* 1993, 4, 44—52.
123. Dwivedi, S. K.; Oates, R. J.; Mitchell, A. G. Peak Offset Times as an Indication of Stress Relaxation During Tableting on a Rotary Tablet Press. *J. Pharm. Pharmacol.* 1991, 43, 673—678.
124. Muller, F. X.; Augsburger, L. L. The Role of the Displacement-Time Waveform in the Determination of Heckel Behavior Under Dynamic Conditions in a Compaction Simulator and a Fully Instrumented Rotary Tablet Machine. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994, 46, 468—475.
125. Venkatesh, G., Pudipeddi, M., Faulkner, P., Correlations Between Compaction Simulator and Instrumented Betapress. AAPS Meeting, November 1993.
126. Venkatesh, G. M.; Lamey, K. A.; Levin, M.; Murphy, S., Correlations Between a Hydraulic Compaction Simulator, Instrumented Manesty Betapress, and the Presstere™. AAPS Meeting, November 1999.

(樊忠译)

Y

牙科用品

Sebastian G. Ciancio

State University of New York at Buffalo, New York, U. S. A

引言

当今有许多产品推荐用于口腔。一些产品包括含氟的牙膏和漱口剂已广泛用于控制龋齿的产生。一些化学药物,如洗必泰、季铵盐可以控制牙斑的产生。控制牙斑的机械类产品包括洁牙线、牙膏和漱口水。也有产品用于治疗口臭、用作局麻剂、敏感牙齿的脱敏、牙齿的漂白、辅助缓解口腔干燥。现今已设计了一些用于口腔局部释放抗菌剂的产品。本章综述了上述及其他一些产品。

使用氟化物控制龋齿

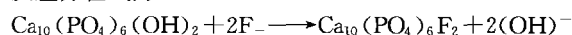
目前,世界上有超过 3 亿的人饮用优质的加氟水。美国公共健康服务社(U. S Public Health Service)参照每年的平均温度,建立了饮用水氟化物浓度的推荐标准^[1]。每日摄入的氟化物不仅来自饮用水,还有消耗的食物以及用加氟水处理过的食物、常用高浓度可溶性氟化物的磷肥进行施肥的农作物,以及一些包含用含氟饲料喂养的动物骨头的食品。

几十年来,人们摄入天然的含氟食物和水,没有出现严重的副作用。另外,美国已广泛使用含氟物质超过 30 年,并且无严重的副作用。斑釉牙是氟中毒最早、最敏感的体征。在过去的 15 年里饮用加氟水,斑釉牙的发病率没有明显的增加。氟化物的安全性、有效性已被确证,没有科学依据反对。

1. 作用机理

氟化物抑制龋齿的作用机理尚不明确。已知羟基磷灰石是釉质的主要晶状结构,而氟离子能替代羟基磷灰石中的氢氧根离子。这种替代的晶体又名氟磷灰石,比原始的羟基磷灰石对由牙斑菌产生的酸有更强的抵抗力。

随着牙齿的生长和釉质的形成,摄入的氟就进入釉质中。由于釉质先形成外层,所以相对而言,釉质的外层会比内层沉积更多的氟化物。部分含有氟化物的釉质会防止龋齿的形成^[2]。另一部分氟化物会进入釉质,以提供对酸的防护。许多研究表明,局部使用的氟化物对早期龋齿釉质形成有益,在早期牙齿的损害中氟化物的摄入量会增加,并伴随有部分牙齿的再矿化。这个发现使一些研究者将氟化物视为再矿化剂和龋齿抑制剂。氟化物进入釉质的化学反应方程式为



牙斑也容易富集氟化物,这可以增加抗酵素的活性,

也可以通过上述手段来保护龋齿。另外,研究还表明,局部地应用氟化物也可降低牙斑表面的平滑度,对牙周组织也有益处^[3]。

当社区供应的水中无氟时,学校饮用水中就应添加氟化物,但这并不能代替社区饮用水的加氟,因为出生后就摄入氟化物很重要。

在一些饮用水中缺乏氟化物的地区,学校饮水中氟化物的水平是社区用水推荐量的 4.5 倍。在氟化物缺乏地区进行了 12 年的研究,研究结果表明,龋齿、缺牙、充填牙的发病率减少 40%。在这个研究过程中未见不希望发生的慢性氟中毒。但应当引起注意,上述情况是每天仅部分时间或在学校的时间摄取氟化物。从出生开始及在恒牙的形成阶段,持续摄入 4.5mg/L 的氟化物就会引起不希望发生的慢性氟中毒^[4]。

2. 治疗作用

2.1 加氟水

含氟化物 1mg/L 的饮用水,能明显减少龋齿的发生。饮用水中含有天然的氟化物就能产生类似的抗龋齿作用。加氟水有如下作用:低于 60% 的龋齿发生率,六年乳牙脱落的发生率减少 75%,上部前端 4 个牙齿的相邻龋齿发病率降低 90%。

有证据表明,在牙齿钙化的过程中有氟化物的加入能显著抑制龋齿的发生。所以,持续饮用加氟水就可能产生最大的益处。

2.2 饮食补充/片剂

一个人从婴儿时期到 13 岁,如果每天补充氟化物,就能对恒牙和乳牙产生最大的益处,因为上述这个阶段是所有恒牙,除了第三磨牙外均处在萌出阶段。如果氟化物不能持续供给,那么防止龋齿的作用会逐步减小,所以阶段性的供给氟化物是必要的。

饮食中氟化物的使用和局部氟化物的使用要根据儿童的年龄而定。较年幼的儿童在饮食中补充氟化物较好,稍大一些的儿童局部使用氟化物对恒牙有益。稍小一些的儿童较易发生龋齿,所以可以联合使用上述两种方法。

在膳食补充氟化物之前,应当先了解儿童居住地饮用水中天然氟化物的浓度。现在,如果特定地质地区的饮用水含氟量略低于推荐的社区用水最佳含氟量的 60%,就应该有限制地补充氟化物。

为了谨慎一些,家中不应储藏大量的氟化钠。一次就医配的氟化钠应不多于 264mg,因为 264mg 已足够至少 4



个月的量（一个疗程）^[5]。每一个包装都应遵循如下声明：小心——放在儿童拿不到的地方。

尽管已有饮用水氟化物的最佳摄入指标，却没有建立每日氟化物的摄入指标。大于三岁的儿童每天的氟化物的摄入量是 1mg，2~3 岁儿童的摄入量是其一半。一种更准确的计算儿童每日氟化物摄入量的方法是依据体重来调整摄入量。例如，每磅体重摄入 0.25mg。但是，大于 6 个月的儿童，无论体重是多少，每天摄入的氟离子浓度不得超过 1mg。为了避免因氟化物中毒而引起的不美观，在饮食中氟化物应减少，以与饮用水中的量相适应。表 1 列举了各社区中自然氟化物的经验调整量，这些社区推荐最佳氟化物的摄入量是 1ppm。该推荐剂量适合大于 6 岁的儿童。6 岁或小于 6 岁儿童的摄入量应该减少，如表 2 所示^[6,7]。

表 1 适用于大于 6 岁儿童的处方氟化物和天然饮用水中氟化物含量的对照表

水中氟化物含量/ppm ¹⁾	氟化钠允许调整量/(mg/d)	提供的氟离子/(mg/d)
0.0	2.2	1.0
0.2	1.8	0.8
0.4	1.3	0.5
0.6	0	0

1) 1ppm=1mg/L。

表 2 适用于小于 6 岁儿童的处方氟化物调整和天然饮用水中氟化物含量的对照表

患者年龄	水中氟化物的浓度 ¹⁾		
	0~0.3ppm	0.3~0.6ppm	>0.6ppm
0~6 个月	0	0	0
6 个月~3 岁	0.25	0	0
3~6 岁	0.5	0.25	0

1) 2.2mg 处方氟化钠=1mg 氟离子。

对于小于 6 个月的婴儿，专家对处方补充氟化物的价值提出疑问。

学校开展的服用含氟片剂的活动，可以预防龋齿。2 年或更多年的氟化物摄入后，龋齿预防率为 20%~40%^[8]。根据文献报道，在扩大的试验中，服用氟化物片剂 8 年后龋齿的发生率减少 36%^[9]。

使用氟化物片剂既能产生萌发前（内源性）的作用，也能产生萌发后（局部）的作用。所以，药片应该咀嚼或在口腔中溶解，在吞咽之前，牙齿应用氟化物片剂溶解的溶液漱口。

和加氟水相比，氟化物片剂能定量释放氟化物。

一天一次的饮食补充氟化物有一个缺点，该氟化物会快速被机体清除。

2.3 哺乳

据测，人体乳汁中氟化物的含量小于 0.05mg/L。在不

考虑饮用水和母体血浆中氟化物水平时，该浓度保持恒定不变。所以，母乳喂养的婴儿不用配方奶瓶喂养，其摄入的氟化物少于使用配方奶瓶喂养的婴儿，因为后者饮用的水中含有 1mg/L 的氟化物。应当考虑给母乳喂养的婴儿补充氟化物。

在一些研究中，让准妈妈补充氟化物，评价是否有益于胎儿牙齿生长^[10,11]。但是其结果并未有力证明其推荐价值。

2.4 维生素

含有氟化钠的维生素制剂有滴剂、片剂和咀嚼片。在一些水中氟化物含量低于 0.6mg/L 的地区，上述补充氟化物的制剂很有用处，而且也可用于儿童氟化物的摄取，其前提是父母知道孩子每日应摄入氟化物的量且儿童也不反对口服药物。在推荐儿童食用含氟化物的维生素制剂时，必须知道饮用水和维生素制剂中氟化物的浓度。

2.5 局部使用

氟化物能够以各种剂型局部使用，为医生提供更多的选择，供患者使用。局部使用的含氟药物在加氟社区使用时，其降低龋齿的作用并不明显。但是，在无氟社区，其作用很明显^[12,13]。在这些社区，局部使用的氟化物是唯一用于治疗氟化物药物。

现在可以使用的氟化物制剂有光亮剂、牙膏、溶液、凝胶、漱口水和预防糊剂等。这些剂型列于下表 3 中。

表 3 各种局部用氟化物制剂

原料	剂型	处方
含氟磷酸盐	局部用溶液	1%磷酸盐中含 1.23%
	局部用凝胶，起泡剂	1%磷酸盐中含 1.23%
	漱口水	0.02%~0.04%
含氟氨基酸	预防糊剂	1.2%
	牙膏	1.6%
	漱口水	2.5%
氟化钠	局部用溶液	2%
	漱口水	2.5%
	起泡剂	0.2%
单氟磷酸钠	光亮剂	5%（每 3~6 个月）
	牙膏	0.76%~0.8%
	局部用溶液	8%
氟化亚锡	漱口水	0.1%
	预防糊剂	8%
	牙膏	0.4%
	凝胶	0.4%

2.6 牙膏

最早使用的含氟牙膏中含有氟化钠。但是,该氟化物不能被机体利用,因为牙膏中的钙经过研磨和氟结合,所以它没有活性。

尽管市场上有很多含氟牙膏,但不是均能提供可被机体吸收的氟化物,因为有些研磨系统所含的氟化物没有活性。所以,该类产品虽然和其他产品含有的氟化物一样多,但是不能被机体利用。同时,若牙膏产品的有效期比较短,市场销售情况不是很好的话,它就会失效。

基于这些原因,只有被美国牙齿联合会科学事务委员会(ADA)认证的牙膏才被推荐使用。这些产品列于该委

员会出版的杂志上,并在包装上印有 ADA 标记。

现在已被认可的牙膏含有单氟磷酸钠、氟化钠或少量的氟化亚锡,如果每天使用就可以减少 25% 的龋齿发生率。一些临床研究表明,含有氟化亚锡的牙膏会使牙齿出现斑点,尤其是在凹陷处和裂痕处^[14]。这些斑点和复合物中的锡有关,它会黏附于牙斑上。明显的牙斑和较差的外观导致对该牙膏的使用越来越少。市场上的含氟化亚锡牙膏一般用塑料容器包装,因为在 pH 酸性条件下,锡离子会和软金属发生反应。

为了更好地理解这个问题,关注那些比较受欢迎牙膏的成分很重要。除了一些个别加强型产品,各种牙膏中含有的氟化物为 1000mg/L。一些含氟牙膏的成分比较见表 4。

表 4 典型的牙膏成分

商品名	氟化物	研磨剂	甜味剂
Aim	0.8% 氟化磷酸钠	10% 氢氧化硅凝胶 19% 氢氧化硅	67% 山梨醇
Aim extra strength	1.2% 氟化磷酸钠		
Aquafresh	0.76% 氟化磷酸钠	12.6% 碳酸钙 12% 硅	52.8% 甜味剂
Colgate®	0.76% 氟化磷酸钠	48.76% 磷酸氢二钙	22% 丙二醇
Crest®	0.24% 氟化钠	20% 氢氧化硅	50% 山梨糖 18% 丙二醇
Macleans	0.76% 氟化磷酸钠	38% 碳酸钙	29.55% 丙二醇

在儿童刷牙时,由于牙膏中大部分的氟化物会被吸收,所以一般只需要在牙刷上放豌豆大小的牙膏即可。

2.7 氟化亚锡

以氟化亚锡为活性成分的牙膏已经不在市场上广泛使用了,但是该成分首先被证实具有降低龋齿的作用,可减少 23%~34% 的龋齿的发生^[15,16]。有一种含有氟化亚锡的牙膏,其中的氟化亚锡是具有专利稳定性的,并声称该牙膏具有降低龋齿和牙龈炎的双重作用。但是该产品并未被 ADA 认可。

现今,没有被 ADA 认可的含有氟化亚锡的非处方牙膏。但是,却有被 ADA 认可的处方牙膏,其疗效被患者和牙医证实。

2.8 氟化铵

在欧洲,一些长期的临床试验证实了含有有机氟化铵牙膏的使用效果^[17,18]。氟化铵也具有较强的减少牙斑的作用。尽管氟化铵比其他形式的氟化物更具降低龋齿的作用,但是 FDA 并未同意这些产品在全国范围内广泛试验。

2.9 氟化钠

氟化钠作为牙膏的一个组分已成为很多临床研究的课题。确保能提供氟离子的氟化钠牙膏的临床龋齿试验证实,其抗龋齿作用与含有氟化亚锡、单氟磷酸钠的牙膏相似。

严格监控的临床试验发现,患者在监督下每天刷牙,其龋齿的发生率降低 25%~48%^[19,20]。

2.10 单氟磷酸钠

含有 0.76% 单氟磷酸钠的牙膏已用于许多临床研究中。含有单氟磷酸钠牙膏的临床研究在严格监控下进行,数据表明,该牙膏能降低 17%~42% 的龋齿发生率^[21~23]。证明其有效性的两例研究是在含氟社区里进行的。在临床研究中,将单氟磷酸钠和氟化钠进行比较,其结果表明二者降低龋齿作用相似。不像含有氟化钠的牙膏,含有单氟磷酸钠的牙膏和许多研磨体有较好的兼容性,这也是在 ADA 目录里有这么多该产品的原因之一。

3. 溶液和凝胶

儿童使用如下配方的产品,龋齿的发生率降低 30%~40%: 2% 的氟化钠,8% 的氟化亚锡,磷酸氟化物产品。但其中一种成分按规定使用时,其效果并不优于其他成分。

8% 的氟化亚锡溶液用于减少龋齿^[24]。当与其他药物同时使用时,牙齿要打磨、干燥、隔离,该过程持续 4min。该溶液的缺点是必须新鲜配制,一些牙齿会出现牙斑(在“牙膏”章节中讨论),并且会出现难以掩盖的不良味道。

局部使用高浓度的氟化物溶液对于龋齿高发的儿童很有效,因为其不仅具有对龋齿的抑制作用,还有预防作用。该产品的使用频率根据龋齿的发病情况而定,如果某地区

儿童龋齿发生率为平均水平,那么3~13岁儿童应当每年使用一次该产品。

凝胶通常是放于一个类盘状的容器里,将其涂于牙齿后凝胶会流到牙齿表面。使用适合患者大小的盘子,研究发现效果最好。据估计,放于盘子中的氟化物,大约只有1/3可以被牙齿利用吸收。除了部分氟化物被吞下,其他剩余的部分就滴于盘中^[25]。

目前尚未规定成人局部使用氟化物的剂量。但一些研究表明,磷酸氟化物可以抑制龋齿。现有报道说,局部使用氟化物之前不必打磨牙齿^[26,27]。这些研究表明,用牙刷足以除去牙齿上的牙斑,并且无须除去牙齿表面的氧化物。

3.1 含氟化物的漱口水

很多研究关注氟化物漱口水抑制龋齿的作用。局部使用氟化物的漱口水,其效果和患者的依从性有关。

幼儿每日使用氟化物漱口,应该对其进行仔细监测。应该注意,ADA不建议小于6岁的儿童使用含有氟化物的漱口水。

此外,当这些产品进入家庭后,会产生潜在的危险,所以ADA组织建议产品中氟化钠的含量不应该超过300mg。含有氟化物的漱口水溶液,如果在学校或社区使用,其体积很大,基于这样的假设,对该产品在人群中的储存和分配要严格进行监控。在未监控下摄取这些产品具有潜在的危险性,这一点应该让父母和孩子都知道。

研究表明,对于生活在无氟社区的孩子使用含有氟化物的漱口水是有效的。还有很多研究正在进行,每日一次使用含有大约0.05%的氟化钠,或者是每周一次使用含0.2%的氟化钠^[28,29]。

科学事务委员会(Council on Scientific Affairs)已经认可了很多氟化物漱口水。下面讨论的所有产品都是ADA组织认可的。

市场上的一些漱口水是浓缩液,要先稀释到推荐浓度水平才能使用。如果要使用浓缩液,必须格外注意,要放在儿童拿不到的地方。该产品不能用玻璃容器包装,因为在玻璃中其pH会偏碱性的。塑料是比较好的选择。该产品的处方药和非处方药如下。

3.2 ACT

本产品是0.05%氟化钠的水溶液。含有8%的丙三醇、7%的乙醇、清洁剂、防腐剂、糖精、色素和调味剂。可以每天使用,无须处方。

3.3 Flurigard

本产品用作漱口水,含有0.05%的氟化钠水溶液、15%丙三醇、5%乙醇、清洁剂、防腐剂、糖精、色素和调味剂。可以每天使用,无须处方。

3.4 Fluorinse

本产品中活性成分是0.2%氟化钠。除此以外还含有清

洁剂、防腐剂、调味剂和色素。可以每天使用,无须处方。

3.5 Phos-Flur oral rinse supplement

本产品是水溶性的,含有0.044%氟化钠、0.055%磷酸、1.35%磷酸氢二钠、调味剂和色素。可以每天使用,无须处方。

4. 脱敏剂

很多研究表明,局部使用氟化物可以降低牙齿的过敏性^[30~32]。在使用浓度从8%氟化亚锡凝胶到33.3%氟化钠糊剂的浓缩剂型时,得到了上述结果。市场上含有氟化亚锡的牙膏可以降低牙齿的过敏性。同时,某厂商销售的含有氟化钠和硝酸钾混合物的牙膏,也可以降低过敏性。含有氟化钠的光亮剂也能降低牙齿的过敏性。

控制牙斑的化学药物

多年来,人们对许多化学药物的口腔抗菌作用及其在口腔保健方面的重要性进行了评价。

1986年,由ADA建立了这些产品的认可指南,促进了临床研究的合理设计,主要是针对那些有潜在治疗作用的成分。获得ADA认可标志的产品有Peridex、Listerine[®]、一些常用的Listerine防腐液仿制品和Colgate Total[®]。

在本节中,按化学药品目录列举了各种可以使用的药物资料。术语“持续性”用来描述药品在口腔中的滞留能力,以及持续释放药物并保持抗菌作用的能力。

1. 洗必泰(双氯苯双胍己烷)

在本章的这些产品中,洗必泰是最有效的。超过对700个人的研究表明,洗必泰能平均减少齿菌斑55%,减少牙龈炎45%^[33~35]。洗必泰的作用机理和菌膜的形成有关,改变细菌的吸附和(或)黏附牙齿的方法、改变细菌的细胞壁都会减轻病情。在化学上,将它分类为双氯苯双胍己烷双糖,美国药物命名委员会(USAN)将它命名为双氯苯双胍己烷葡萄糖酸酯,其持续性较高。已报道的副作用包括生成牙斑、儿童牙齿的可逆性脱落、味觉改变、增加牙龈上钙的沉积。长期微生物学研究表明,并没有增加耐药菌株。它在美国作为处方药,该漱口水(Peridex、PerioGard和仿制品)的浓度为0.12%,含有11.6%酒精,pH为5.5。经ADA批准用于控制牙斑和牙龈炎。建议一天使用两次。

2. 氟化物

据说氟化物有抑制牙斑的作用。广泛使用的局部起效的氟化物有氟化亚锡、磷酸氟化物和氟化钠。在氟化物中,氟化亚锡的短期研究表明该产品有开发前景。然而,长期研究发现其会生成浅的牙斑,但差异并不明显^[36,37]。除一个研究外,其余均未发现该产品对牙龈健康有效。



氟化亚锡的作用机理与改变细菌聚集、代谢有关。总的来说,氟化亚锡有中等的持续性,抗菌活性可能和锡离子有关,最有效的浓度为 0.4%。氟化亚锡被认为是氟化物中最毒的且保质期最短。其副作用是味觉改变、在牙齿上生成黑色的线。每天使用一到两次顺从性较好。氟化亚锡最常用作水凝胶。

氟化亚锡用作补足氟化物的产品已经获得 ADA 的认可,但并未证实其有减少牙斑的作用。已认可的产品有 Activux Basic Control[®]、Gel-Kam[®]、Gel-Tin[®]、Perfect Choice[®]、Pro-Dentx[®]、Schein Home Care 和 Super-Dent[®]。

3. 氧化剂

在评价氧化剂的作用时,也必须评价最佳效果点和测定方法。氧化剂有抗炎的作用。因此使用氧化剂后期望探诊出血较少,炎症的主要体征减轻,但致病菌感染并不一定会减少,在牙膏中也发现有过氧化物,它和碳酸氢钠联合使用的浓度是 1.5%或更低。在漂白剂中也发现有过氧化物,这将在后面讨论。没有得到氧化剂的长期研究结果,短期研究结果相互矛盾,提出了长期使用的安全性问题^[38,39]。

4. 酚类化合物

4.1 Listerine 防腐液类

短期研究酚类化合物后发现,它可平均减少牙斑和牙龈炎 35%;长期研究表明,平均减少牙斑 35%,平均减少牙龈炎 30%^[40~42]。

在这类产品中, Listerine 防腐液是唯一被充分研究的产品。Listerine 防腐液是麝香草酚、薄荷醇、桉油精和水杨酸甲酯的精油混合物。其作用机理和改变细菌细胞壁有关。本产品是中性的,持续性较低。已报道的副作用有灼烧感和苦味。它在乙醇中的浓度为 21.6%~26.9%, pH 为 4.2。推荐剂量是每天两次,它及其部分仿制品已被 ADA 认可,用于控制牙斑和牙龈炎。

4.2 Plax

该产品只有短期的。较少有患者参与的临床研究发表过。这些探索性研究表明,当本品用作刷牙前的漱口水可以减少一些牙斑^[43]。未报道它对牙龈炎有效。其他的长期研究怀疑本品有减少牙斑、牙龈炎的效果。

本品的活性成分是苯甲酸钠,但含有 Listerine 防腐液 30%的成分。它含有 7.5%酒精。用法是刷牙前漱口。它未得到 ADA 认可。

5. 季铵化合物

季铵化合物对牙斑和牙龈炎的作用在很多短期研究中进行了评价。在这些研究中,已报道其可以平均减少牙斑 35%,对牙龈健康有混合效果^[44,45]。一份 6 个月的研究报道表明,它可以减少 14%的牙斑,24%的牙龈炎^[46]。

Cepacol[®]、Scope[®] 和 Advanced Care Viadent[™] 都是本类中著名、典型的产品,其中每个产品均含有约 0.05%的十六烷基苯基偶氮二氨基吡啶氯化物。另外, Scope[®] 还含有 0.005%度米芬。其作用机理与增加细菌细胞壁的渗透性有关,加速细胞壁的溶解,减少细胞代谢,削弱其黏附齿面的能力。这一产品为阳离子产品,其能与牙齿、牙斑的阴离子表面相吸。它们也是表面活性剂,可以改变表面张力,有一定持续性。

其副作用是生成牙斑、口腔有灼烧感。它们在乙醇中的浓度为 14%~18%, pH 为 5.5~6.5。建议每天使用两次,未获 ADA 认可。

5.1 血根碱

血根碱的短期研究表明,可以减少牙斑和牙龈炎^[47,48]。牙膏中本品的长期研究表明,它不能显著减少牙斑或牙龈炎,但有一个研究将本品用作牙膏和漱口水的除外^[49,50]。

认为其作用机理是改变了细菌细胞的表面、减少细菌的聚集和黏附。

血根碱(benzophenathradine)源自罂粟科植物(血根草属 *canadensis*)。本品的提取物浓度是 0.03%,相当于 0.10%血根碱。它含有 0.2%氯化锌。本品是阳离子,持续性的效果不详。它的副作用是灼烧感和可能引起上皮细胞发育异常。它被用于 Viadent 牙膏和 Viadent 漱口水中。漱口水的 pH 是 4.5,牙膏的 pH 是 4.8,漱口水的酒精含量是 11.5%。它未被 ADA 认可。

5.2 三氯生

Triclosan(2,4,4'-三氯-2'-苯酚酯)是牙膏中新的抗牙斑和牙龈炎的成分。在三氯生中加入乙烯基甲基醚马来酸共聚物(Gantrez)后可以改善在硬、软表面的滞留时间(持续性)。高露洁的很多处方已获 FDA 批准,在美国销售,也获得了 ADA 的认可。根据批准本品可用于减少牙斑、牙龈炎、牙垢和龋齿。早在 1973 年就研究发现,该化学物质有广谱抗菌性,抗菌范围包括口腔中的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。三氯生用于治疗口腔病原体的最小浓度是 0.3mg/mL,且其抗菌活性并不受阴离子化合物的影响,如十二烷基硫酸盐,它是牙膏、漱口水处方中的必需物质,被广泛使用。剂量低于 0.5%时,影响口味最小,但是当浓度高于 0.5%时,就会产生异味。

5.3 枸橼酸锌

控制牙垢的牙膏中含有枸橼酸锌,本品可减少牙斑、牙龈炎。Mentadent[®]、Advanced Care Viadent[®]中也含有该物质。含有该成分用于减少牙斑和牙龈炎的牙膏,未得到 ADA 的认可。

控制牙斑的机械法

一种较好控制牙斑的机械流程包括刷牙、用牙线洁牙



和专业的预防。一般建议一年至少做两次专业的洁牙，除去牙龈上和牙龈下的牙斑和牙垢。

1. 刷牙

最近，在美国对刷牙习惯的调查发现，只有 60% 的人严格遵循刷牙规范。显然，在该地区还需要动员和教育。

对一般的成年人而言，圆毛的软牙刷能最有效地除去上牙龈牙齿表面的牙斑（除了两颗牙齿之间的表面外）。大多数的牙刷毛是尼龙的，末端是圆形的。去除下牙龈牙斑的深度只有几毫米。有严重呕吐反射的患者，建议使用儿童牙刷。另外，发现在这些患者的舌头上放一些食盐对用张口器检查有帮助。

对刷牙方法的研究表明，彻底完全地刷牙比刷牙技术更重要。在美国，最广泛使用的刷牙方法是将牙刷毛以 45° 接触牙龈，温和地伸入后轻轻地摇动。这种动作是以椭圆形方式进行的，这比来回刷牙的方法好。电动牙刷有特殊的用途，适合那些运动协调性不好的人群以及那些用手动牙刷不能除去牙斑的人。对于儿童而言，电动牙刷比较新奇，有促进其使用的作用。很多研究也发现，电动牙刷除去牙斑的效果优于手动牙刷 10%~15%。

2. 用牙线洁牙

研究发现，只有 25% 受调查人群定期使用洁牙线。牙线洁牙对除去牙齿和牙龈间的牙垢很重要，因为那个位置是牙刷无法刷到的。由于牙垢特别容易在这些地方滋生，所以牙医认为用牙线洁牙事实上比刷牙更重要。

手不灵活的患者需要用牙线洁牙时，可以使用各种牙线洁牙的固定装置或电动牙间清洁剂（如 braun interclean 和 waterPik interdental cleaner）。牙科用洁牙线有蜂蜡型、薄蜂蜡型和无蜂蜡型。很多牙医认为，薄蜂蜡型和无蜂蜡型洁牙线能最有效去除牙斑。如果在使用的時候，洁牙线被撕碎了，就会发现在牙齿之间或有缺陷的牙齿处，有腐蚀迹象。但是新上市的新型洁牙线不会被撕碎，较易使用。第一种新型洁牙线是 Glide Floss，之后高露洁和欧乐 B 也推出了类似的产品。

3. 显色剂

显色剂类似于食品中的色素，它用于口腔牙龈上的牙斑染色，使其易于被观察到。有液体和固体片剂各种显色剂，可以在牙医诊所和家里使用，能使患者注意到牙斑的存在，并提醒患者自己未能有效除去牙斑。

4. 牙膏

广告中，大多数牙膏处方中都有特殊配方，能控制生成牙斑。牙膏中除了含有氟化物，还会有起泡剂和温和的研磨剂，这两者都有利于去除牙斑。但是只有高露洁牙膏被 ADA 认可，活性成分经证明可以抑制、控制牙斑生成，减少牙龈炎，其活性成分是三氯生。使用有抑制牙斑作用的牙膏刷牙的效果优于不用牙膏刷牙，因为牙膏会激励人

们刷牙的时间更长、更彻底。事实上，这才是刷牙除去牙斑的作用机理。

牙膏作为一种有效的载体，可以在牙齿表面释放出氟化物和三氯生，尽管氟化物对于龋齿菌及其酶有效，但它的主要作用是使牙齿表面更能抵抗龋齿菌的破坏。除了高露洁，ADA 认可其他牙膏中氟化物的抗龋齿作用，而不是减少牙斑、牙龈炎的功效。

5. 其他口腔保健用品

很多装置有助于除去牙齿间表面、假牙架周围和其他很难触及处的牙斑。这些用品的缺陷是它们可以较好地控制上牙龈的牙斑，但除去下牙龈牙斑的深度只有几个毫米。所以，它们去除下牙龈缝隙较深地方牙斑的效果最差，如牙周炎。

市场上销售的各种口腔用冲洗设备可以除去黏附较松的牙斑，牙齿以及牙用支架、设备上的颗粒^[51]。由于它们不能有效地除去所有黏附的牙斑，所以不能替代牙刷和洁牙线，不过可以用作上述产品的辅助器^[52]。另外，口腔用冲洗设备时不能到达下牙龈除牙斑。但是，据介绍，下牙龈用的设备头允许顶部喷射 6~7mm 高的溶液。

一些研究表明，冲洗设备的冲洗作用可以改变流出的细菌内毒素所引起的牙斑成分^[53]。有严重牙龈组织炎症的患者在使用冲洗设备时要注意使用低压力，如果组织严重感染，要避免组织被撕裂而加重了现有的病情。

减少牙石的产品

很多牙膏和漱口水产品可以减少牙病患者下牙龈的牙石^[54,55]。含有焦磷酸、锌盐、三氯生和木瓜蛋白酶的牙膏可以减少牙石。

牙石的发病率是 45%~66%，因性别、年龄的不同而有所差异。尽管上牙龈牙石并不是牙龈炎或牙周炎的主要病因，但牙龈表面的间隙提供了牙斑生成的环境。另外，由于牙龈表面生成了牙斑，所以牙石就成为牙斑的传递系统。尽管牙斑的形成与牙龈炎、牙周炎很相关，但是未见牙石有类似相关性的报道。因此，ADA 未建立减少牙石产品的认可程序，因为这主要是美容方面的问题，而不是疾病方面问题。

减少牙石化学品的作用机理是抑制磷酸钙晶体的生长以及中断磷酸钙（在食物和唾液中发现）转变成牙石。上述反应是这样发生的：

（1）牙齿表面的该化学物质可以阻断唾液中沉积的磷酸钙与受体结合，也阻断其被受体吸收后形成牙石。

（2）在牙石底物最初形成的时候，该受体也会阻断其增长。

（3）焦磷酸复合物会和唾液中游离的钙结合，抑制其黏附在牙齿表面（这可能是次级反应机理）。

由于这些产品减弱了矿化作用，所以我们担心牙齿可能会发生过度去矿化。所有的生产商都很关注这个问题，

但有报道说这并不要紧,因为氟化物能促使牙齿或釉质再矿化。

一些患者不能使用含有焦磷酸的控制牙石的牙膏,因为它使用后会出牙组织敏感和剥离^[56]。未报道不含有焦磷酸的控制牙石产品有上述不良反应,如 Den-Mat 公司的产品 (Rembrandt® 牙膏)。

1. 控制牙冠牙垢的牙膏

控制牙冠牙垢的牙膏含有 3.4% 的焦磷酸四钠, 1.37% 的焦磷酸二氢钠,可以减少牙垢的产生。预防、减少龋齿的牙膏中还含有 0.243% 的氟化钠。这是进入美国市场的第一个用于减少牙垢的牙膏。根据多个临床研究显示,预计可以减少 30%~40% 的牙垢,也可以明显减少患者因使用洗必泰所引起的牙齿色斑。

2. 控制牙冠牙垢的漱口水

漱口水中含有 1.6% 的焦磷酸离子,其来源于焦磷酸二钠和焦磷酸四钠,用于抑制牙石的形成;还含有 0.05% 的氟化钠,用于减少龋齿。在撰写本章时由于该产品正处于市场测试阶段,所以未得到本品有关减少牙石和龋齿的数据。

3. 抑制牙垢的高露洁牙膏

公司专利名为 Gantrez 的减少牙垢的产品中,含有 5% 的焦磷酸四钠和多聚脂肪酸。还含有 0.243% 的氟化钠,该成分用于预防和减少龋齿。基于各临床研究,预期可以减少 35%~50% 的牙石。就减少牙垢这方面的作用而言,它和 Crest 一样,一些临床研究甚至发现它还优于 Crest。

4. 抑制牙垢的高露洁漱口水

漱口水中含有焦磷酸四钠和焦磷酸四钾,可以生成 1% 的焦磷酸离子。其中还含有 0.02% 的氟化物。有报道,每天漱口两次,可以减少 35%~40% 的牙垢,但不能减少龋齿。

5. 抑制牙垢的 Listerine 漱口水

Listerine 漱口水中含有 0.09% 的氯化锌,用于减少牙垢;其他成分和 Listerine 漱口水相同。

6. 伦布兰特口气清新剂

由于本品处方中有表面活性剂以及含有木瓜酶的柑橘叶黄素,所以可用于减少牙垢。

Targon®: 由于漱口水中含有表面活性剂,所以本品可用于减少牙斑。引进这些产品后,就可提供给医生各种剂型和香味的产品。如果某医生要推荐一种减少牙垢的产品,要选择患者最喜欢的产品,同时也不能降低患者对牙斑控制的关注程度。例如,如果他早已不使用漱口水,那么他使用医生推荐的产品后是否不会不重视刷牙和用牙线洁牙等减少牙斑和龋齿的机械方法呢?

口臭

口臭可能是由局部因素、全身因素或二者结合引起的。据估计,80% 的口腔气味是由口腔局部因素引起的,这些气味常和龋齿、牙龈炎和牙周炎有关。由于各种细菌作用于蛋白质,如口腔剥落的上皮组织、唾液蛋白、食物残渣和血液会引起口臭^[57,58]。

研究表明,有牙科疾病的人的唾液会比那些没有牙科疾病的人的唾液更容易产生恶臭。观察发现,延长减少唾液流动的时间并禁食、禁水后,口臭会发展至最严重。

各种口腔细菌引起的产物会降解为很多化合物,最先生成的有硫化物和黏蛋白,这些化合物一般都和口臭有关^[59]。口臭通常是由口腔中细菌介导的降解反应生成的甲硫醇和硫化氢引起的。降解反应也会生成氨水,但它不会加重口臭。甚至有人认为氨水可以改善口腔气味。

控制口臭要直接作用在它的病因上。如果是由局部因素引起的,就应当努力将病因消除。如果口臭是由全身因素引起的,就需要咨询医生了。但是,对很多患者来说,全身或局部因素很难界定。一些患者用刮舌头的方法来除去口臭。

漱口水和牙膏的美容功能可以减少口臭,通过掩盖口臭、抗菌以及二者兼有的方法起效。目前,还没有 ADA 认可的消除口臭的产品。

局部麻醉剂

局部麻醉药能扩散进入口腔黏膜。由于很多用于神经阻滞或渗透的高效麻醉药物不能完全透过黏膜,所以其不能用于局部麻醉。

用于浅层麻醉的麻醉剂浓度为 2%~5%,局部麻醉剂的起效时间是 2~5min,作用时间相对较短,使用区域的麻醉深度较浅。有一个例外,含有 10.4mg 的利多卡因贴膜通过黏膜吸收,使用 5min 后深度可至牙龈。通过口腔黏膜使用的全身吸收的局部麻醉剂起效快,血药浓度水平接近注射剂^[60]。

一些局麻药在水中溶解不好,但溶于有机溶剂,可以用酒精、丙二醇、聚乙二醇、挥发油和其他适合表皮使用的溶媒来配制。它们的吸收速度较慢,这使其用于刮伤、撕裂伤的局麻更安全。该产品用于短时间的麻醉。

局麻药可以暂时缓解溃疡、伤口和其他受伤部位的疼痛。注射前,局麻药可以产生浅麻醉。本品也可用于有强制呕吐反射患者进行印模或口腔内 X 射线片时。

患者如果对非经胃肠道吸收的局麻药过敏,那他也会对局部给药的麻醉药过敏。另外,由于该麻醉药被吸收入体循环,所以疏忽时过量使用会产生全身中毒症状。由于是注射剂,所以必须对全身中毒症加以处理。可以通过限制该药物的浓度、使用的部位和使用总量来减少对药物的吸收。一般来说,局麻药注射使用时,其浓度不应超过

最大推荐剂量的 1/4~1/2。

一些市场上销售的局麻药灌装在喷雾装置中。该装置使喷出的药量和药物到达的部位很难控制。如果药物被喷到口腔的后部,那么患者吸入的气雾剂很多,足以引起中毒反应^[61]。在后咽处使用局麻药,可能会改变吞咽反射。

1. Benzodent

Benzodent 为酯类局麻药,吸收较差,因为它含有苯佐卡因,该药的水溶性较差,置于含有凡士林、羧甲基纤维素钠的基质中。丁香酚用作防腐剂,也有止痛的作用。硫酸羟喹也是防腐剂,该软膏可以直接用于擦伤或溃疡,全身反应较小。有时,该药也可暂时缓解牙疼和损伤疼。

2. Hurricaine

Hurricaine 是酯类麻醉剂,含有苯佐卡因,基质为聚乙二醇,并加入矫味剂。它有液体制剂、凝胶和喷雾剂。喷雾剂的抛射剂是 A70。

3. Butyn

Butyn 是酯类麻醉剂,含有布他卡因和用作防腐剂的苯甲醇。通常为软膏。最大剂量是 4% 的溶液使用 5mL 或 200mg。

4. Cetacaine

Cetacaine 是酯类麻醉剂,由盐酸丁卡因(2%)、对氨基苯甲酸丁酯(2%)和苯佐卡因(14%)构成。洁尔灭和十六烷基二甲基溴化铵是表面活性剂,促进苯佐卡因透过黏膜组织。

丁卡因通过生物膜能迅速被吸收,不需要促进剂。本品中含有丁卡因,由于其毒性大、吸收快,所以服用时应谨慎,不能放置在假牙下。使用本品喷雾比较危险,因为患者会以气雾的形式吸入。最大使用剂量为 20mg 或 1mL 2% 的溶剂。Cetacaine 有液体制剂、软膏、喷雾剂和凝胶。

5. 利多卡因

本品是酰胺类麻醉剂,为水性基质中的利多卡因碱基,本品为 2% 的黏性制剂,含有 2% 的利多卡因、羧甲基纤维素钠、糖精钠、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、香料和纯水。液体制剂中含有 4% 的对羟基苯甲酸甲酯、氢氧化钠和矫味剂。另外一种剂型是 5% 的软膏,含有 5% 的利多卡因、聚乙二醇、聚丙二醇和香料。最大剂量是 300mL 的 5% 液体制剂,或者 15mL 的 2% 的黏性制剂。

牙膏和敏感的牙齿

有时患者会抱怨牙齿遇冷、遇热会过敏,这样的牙齿通常已经暴露了牙根,有时还缺少牙骨质。大多数牙齿如果长在口腔中正确的位置,那么只有釉质会暴露在口腔中,

这样的牙齿偶尔也会对过冷、过热有反应。

事实上,牙齿过敏会对热和触觉变化反应更敏感,有时会引起严重的疼痛。暴露的牙根如果接触热也会有这样的反应,这是由于牙龈萎缩或正在进行牙龈治疗造成的。

已经有一些理论解释牙齿过敏:牙本质小管的神经兴奋,是将刺激传递到牙髓,或者淋巴液出现在牙本质小管中^[62]。后者暴露的牙本质会使胶质作用于小管的压力增加,从而增加破牙质细胞的压力。另一种原理是水力作用,小管内的液体会向任何一个方向运动,从而引起牙髓的神经痛。尽管没有一种理论得到证实,但是还是有各种方法可以封闭、缓解疼痛。各种牙膏推荐用于治疗牙齿过敏,也取得了一些成功。

含有 5% 硝酸钾的牙膏,如 Sensodyne®、Rembrandt、Crest、AquaFresh® 和 Protect 以及含有氟化物的牙膏用于治疗过敏,就取得了巨大的成功。近来,已经使用含有硝酸钾和氟化亚锡的牙膏治疗过敏(高露洁)。

这些牙膏的作用机理是封闭牙本质小管,阻止来自口腔的刺激通过小管刺激牙神经。含有钾的牙膏可以去极化神经纤维,减少刺激的产生,也就减少了疼痛。

为了取得最好的效果,患者必须使用这些牙膏中的某一种持续至少一个月。如果一个月后没有效果,建议使用其他牙膏或其他方法。

含有氟化钠的局部用牙齿光泽剂可以减弱牙齿过敏(如 Duraphat 和 Fluor-Protect),也可以减少牙根表面的龋齿。

1. 漂白剂

可以将牙齿漂白剂分为浅层漂白和深层漂白,或者分为需要医生帮助在诊所漂白和患者在家自己漂白。漂白牙齿时,可单独使用过氧化氢,其含量是 30%,也可使用稳定的尿素过氧化物凝胶,含过氧化氢 10%~22%,其分解后生成过氧化氢(10% 的尿素过氧化物生成 3.35% 的过氧化氢)、尿素、氨水和二氧化碳。FDA 未批准过氧化物水溶液可以作为家用牙齿漂白剂。

2. 深层漂白

深层漂白剂效果可靠,用于消除因牙髓炎或破坏血液产品引起的牙斑,也可以减少牙髓腔内的斑点。深层漂白一般需要在医生诊所内进行。

3. 浅层漂白

浅层漂白用于因年龄、氟化物或四环素引起的牙斑^[63]。浅层漂白可以由牙医、工作人员,也可以由患者自己在家进行。同时,接受医生实施的漂白和自助漂白,就叫做“双重漂白”。

由医生在诊所实施的浅层漂白使用 Superoxol 或 30% 的过氧化氢,可以定期进行漂白。含有磷酸的溶蚀性凝胶可以增加漂白剂在龋齿部位的渗透性。光照可以产生热量,增强漂白作用。为了防止复发,浅层漂白需要每隔 1~2 年



进行辅助治疗。严重的牙斑也需要经常治疗。

有医生监督的自助漂白是指患者在家自己使用含有漂白剂的装置将漂白剂紧贴牙齿^[64]。达到预期的漂白目的后,在1~4个月的治疗周期内,整晚使用该漂白剂,就可以使牙齿有光泽。

浅层漂白的效果很少是持久的,如持续1~4年,以后牙齿会渐渐还原为原来的颜色。通常患者的年龄越小,使用漂白剂的时间就越长。牙齿越难漂白,就越有可能将其脱色。蓝灰色牙斑比黄色牙斑复发更快,因为牙斑的复发是不可预计的,不能保证治疗效果维持的时间。通常,深层漂白比浅层漂白持续的时间更长。

4. 美白配方

美白牙齿有两种作用机理:一种是机械法,用研磨的方法除去牙齿上的残留物;另一种是使用过氧化氢,它与水反应生成氧自由基,可以美白牙齿;或者将机械法和化学法相结合。后者的作用机理是使用漂白剂时发现的,其效果比美白法更持久。

5. 口腔干燥

很多人认为随着年龄的增加,唾液会明显减少,这种观点在很多涉及该问题的文献中得不到支持。年龄并不是导致口腔干燥的主要原因^[65]。但是,年龄较大的人可能服用一些有口腔干燥副作用的药物,所以年龄就加重了药物所引起的唾液减少。

基于这些原因,大多数有关唾液减少的研究集中在老年患者身上。一份研究报道了抗胆碱药物、镇静剂、催眠药与口腔干燥的直接关系^[66]。超过400种药物被确认为有潜在减少口腔唾液的作用,这些药物通过直接或间接作用于胆碱能系统而起效^[67]。另一项研究发现,引起唾液减少的药物使用频率随着年龄的增长而增加,使用最多的是养老院的患者。有超过30类处方药和非处方药会引起唾液减少。

其他可能引起唾液减少的原因有全身性疾病和遭受辐射^[67]。在诊断不同的口腔干燥症状时,这些因素都应当考虑。

6. 口腔干燥引起的临床问题

唾液减少引起的临床问题包括咀嚼食物困难、戴假牙困难、多发性龋齿、牙根表面龋齿和口腔念珠菌病(程度较低)。在患者身上发现任何一种上述状况,都和年龄无关,在诊断这些问题时都应考虑到与唾液减少有关。

7. 治疗

患有唾液减少疾病的患者的治疗应遵照以下规定:①患者的内科医生要改变药物和剂量时,应咨询其牙医;②要用喷雾的方式使用人造唾液;③使用口腔润湿剂和嘴唇清香剂;④食用不含蔗糖的硬果糖;⑤经常饮水;⑥使用无咖啡因产品;⑦每天使用3~5次毛果云香碱(salag-

en);⑧日常饮用含有柑橘和菠萝的香料。

抗生素的局部释药

在过去的几十年里,很多牙科医生的重大研究和产品革新是关注牙周炎的局部抗生素使用。在美国有3种局部释药的产品,在世界上的其他国家还有另外2种产品。

尽管治疗时该药抗菌原理明确,但其局限性也很明显。在进行全身治疗过程中,如果药物的使用剂量不至于引起全身副作用的话,就很难达到抗菌或杀菌浓度。细菌耐药性的增加也是一个问题。抗生素耐药性的增加以及疾病产生的菌株是现今主要的公众健康问题。长时间、重复使用抗生素来治疗牙齿感染是令人泄气的,因为这样用药更容易引起耐药性^[68]。应当消除感染引起的原因,而不仅仅只是“管理”抗生素。一旦开始了抗生素治疗,就必须让患者认识到依从性的重要性,如治疗期间服用药物的剂量。如果患者的依从性较差,就可能引起低剂量,接着就会出现细菌耐药性。

1. 药物的控制释放

全身治疗的局限性促进了对可选择的给药系统的广泛研究。在青光眼治疗过程中,一次植入局部控释给药系统可以持续一周眼部的毛果云香碱的给药。口腔中有一些较易治疗的疾病,需要局部给药。局部治疗牙周炎的困难是药物要到达深部,并长时间维持抑菌或杀菌的有效浓度,但又不能引起耐药性。下面是有关美国市场上各种产品的概要介绍。

1.1 含四环素的纤维(Actisite®)

美国第一个局部给药的产品是乙烯和乙酸乙烯酯共聚物纤维,已被广泛研究,其直径是0.5mm,含有四环素12.7mg/9in(Actisite®四环素纤维,由美国阿尔扎公司生产),当药物被包裹在牙周袋中,就可以被口腔中的组织耐受,10天里维持四环素的浓度超过1300μg/mL,这个剂量远远超过了牙周袋外抑制病原体生长所需的浓度,32~64μg/mL^[69,70]。相反,据报道,四环素全身给药的龈沟液浓度只有4~8μg/mL,剂量是250mg,每天4次,共用10天,口服总剂量为10g^[68]。所以,控释定位给药的四环素浓度为全身口服给药的约1/1000时,就有杀菌的作用。

研究表明,在齿根刮除术和根面平整术中使用或不使用四环素纤维,都可以减少探查的深度,减少探查术中的出血量和牙周病原体,使临床黏合水平提高。这样的效果明显好于仅实施齿根刮除术和根面平整术或手术中仅使用安慰剂纤维素。齿根刮除术和根面平整术中用纤维连接后,统计学分析证明,探查的深度明显减少,临床黏合水平提高超过60%,探查术的出血量少于治疗后6个月的根刮除术和根面平整术^[71]。

Actisite®是第一个局部给药的药物,由于它用于多发性牙周炎的辅助治疗,所以被FDA批准了。尽管6个月的



研究已经证明了它的作用,但是还需要做长期试验。

1.2 洗必泰的释药系统 (PerioChip®)

局部控释给药系统较新的发展之一是,用防腐剂洗必泰作为抗菌剂,这已在很多国家使用;最近,FDA批准其在美国使用。PerioChip®(由 Perio Products Ltd. 生产)的给药系统是在以色列开发的,在美国和欧洲试验过。

PerioChip®是小条状(4mm×5mm×0.35mm)。由生物可降解的、可水解的明胶组成,每片中含有2.5mg的葡萄糖酸洗必泰。它的两头是圆的,比较容易插入,不到1min就可以进入5mm或更深的牙周袋。PerioChip®释放洗必泰,并维持至少7天里药物在牙龈沟中的浓度大于100mg/mL,大于大多数口腔细菌的抑制浓度^[72]。由于PerioChip®在7~10天里可生物降解,所以不需要安排第二次除去残留物。PerioChip®的研究持续了9个月^[73],在第9个月,和基线相比,活性药物加上齿根刮除术和根面平整术的探查深度比对照组(齿根刮除术和根面平整术)明显减少:洗必泰碎片加上齿根刮除术和根面平整术的深度是(0.95±0.05)mm,安慰剂加上齿根刮除术和根面平整术的深度是(0.69±0.05)mm;齿根刮除术和根面平整术的深度是(0.65±0.05)mm($P=0.000\ 01$),探查深度减少2mm或更多,那么洗必泰组与单一齿根刮除术和根面平整术组相比,牙周袋与探查深度的比值就会增加,但每个患者的基础值有显著性差异($P<0.000\ 1$)。在第9个月,洗必泰组比对照组临床黏附水平明显提高,统计发现两组的提高值有显著性差异($P<0.05$)。有活性药物碎片组比两对照组的探查出血量减少,统计发现这两组中的一组($P<0.05$)有显著性差异($P=0.012$)。

研究结果表明,在牙周疾病的治疗过程中,PerioChip是齿根刮除术和根面平整术中很有用的辅助药物。该产品放置简单,不需要为除去再就医;此外,减少牙周袋的深度与在牙龈下放置抗生素类似。还没有在世界上很多国家使用。该给药系统的主要优点是其活性成分是防腐剂,代替了抗生素。

2. 强力霉素在下牙龈的释药 (Atridox®)

Atridox(由 Atridox 实验室生产)是最近发展起来的一个凝胶给药系统,它将抗生素(10%的强力霉素)加入管状的凝胶给药系统。起初,从 Beagle 犬的动物试验发现,该系统对强力霉素的局部给药有益^[74],可用于兽医中。

设计了一个多中心的为期9个月的临床试验,在下牙龈上分别放置强力霉素、溶剂和草药(血根草)^[75],比较它们的作用。任何一组患者都没有接受过齿根刮除术和根面平整术,各试验组都接受药物治疗。试验中要求患者保持口腔卫生并随机进行分组,分为溶剂对照组、溶剂空白中含5%的血根碱组、溶剂空白中含10%的强力霉素组。

除了第3个月的临床黏合水平值,在整个试验阶段,强力霉素的治疗效果都优于其他药物。作者用起始探查深度作为评价指标,强力霉素组的治疗效果与其他两组明显

不同,因为治疗前的探查深度增加了。强力霉素组在第9个月的临床黏合水平下降,这表明和溶剂空白组相比就增加了0.4mm。探查深度比溶剂空白组减少0.6mm,探查出血量比溶剂空白组减少0.2个单位。尽管差别很小,但是在统计学上具有显著性差别。在整个试验中,三组患者的口腔卫生值(牙斑指数)平均在0.7~1.1。尽管本次试验没有评价耐药性,但局部使用强力霉素的前期研究表明,口腔细菌的耐药性会瞬间升高,但外来病原体没有过度生长^[76]。

现有的数据来自两个临床研究中心^[77]。超过9个月的试验发现,所有治疗组的数据和基线相比都有提高。强力霉素组的所有测定结果明显好于溶剂空白组和口腔卫生组。与齿根刮除术和根面平整术相比,强力霉素的临床黏合水平增加,和探查深度减少的效果是一致的。

临床研究表明,下牙龈使用强力霉素有潜在的治疗牙周炎的作用。但该产品用作齿根刮除术和根面平整术辅助药物的作用未经测试。FDA批准该产品用于动物和人。

宿主调整

1998年,第一个用于治疗牙周疾病的非抗菌药物 Periostat 被 FDA 认可。虽然如此,在抗菌类药物中,该药的使用剂量太低以至于不能杀灭细菌。Periostat 通过抑制金属蛋白酶,如胶原酶和白明胶酶而起效。治疗的目的是调整宿主的炎症反应。Periostat 是20mg的盐酸强力霉素胶囊,根据处方规定每天服用两次。其作用机理是抑制胶原酶的活性,该酶是由分叶核白细胞产生的。尽管这个药物属于抗生素类,但是它没有任何杀菌作用,因为每天两次20mg的剂量太低,不足以影响细菌。因此,该药的耐受性不会增加。

在超过650名患者中进行的四项双盲、多中心的临床研究表明,Periostat 提升了专业牙龈护理的效果,减慢了疾病发展的进程^[78]。

参考文献

1. Maier, F. J. Manual of Water Fluoridation Practice; McGraw-Hill: New York, 1963; 48—59.
2. Brudevold, F.; Gardner, D. E.; Smith, F. A. Distribution of Fluoride in Human Enamel. J. Dent. Res. 1956, 35, 420—429.
3. Tinanoff, N.; Brady, J. M.; Gross, A. The Effect of NaF and SnF₂ Mouthrinses on Bacterial Colonization of Tooth Enamel: TEM and SEM Studies. Caries Res. 1976, 10, 415—426.
4. Horowitz, H. S.; Heifetz, S. B.; Meyers, R. J.; Driscoll, W. S.; Korts, D. C. Evaluation of a Combination of Self-Administered Fluoride Procedures for the Control of Dental Caries in a Nonfluoride Area: Findings After Four Years. JADA 1979, 98 (2), 219—223.
5. Council on Dental Therapeutics, American Dental Associ-

- ation. JADA 1975, 91, 1250—1251.
6. Newbrun, E. Current Regulations and Recommendations Concerning Water Fluoridation, Fluoride Supplements, and Topical Fluoride Agents. J. Dent. Res. 1992, 71 (5), 1255—1265.
7. Levy, S.M. Review of Fluoride Exposures and Ingestion. Commun. Dent. Oral Epidemiol. 1994, 22 (3), 173—180.
8. DePaola, P.F.; Lax, M. The Caries-Inhibiting Effect of Acidulated Phosphate-Fluoride Chewable Tablets: A Two-Year Double-Blind Study. JADA 1968, 76, 554—557.
9. Driscoll, W.S.; Heifetz, S.B.; Brunnelle, J.A. Treatment and Posttreatment Effects of Chewable Fluoride Tablets on Dental Caries: Findings after $7\frac{1}{2}$ Years. JADA 1979, 99 (5), 817—821.
10. Glenn, F.B. Immunity Conveyed by Sodium-Fluoride Supplement During Pregnancy; Part II. ASDC J. Dent. Child. 1979, 46 (1), 17—24.
11. Glenn, F.B. Immunity Conveyed by a Fluoride Supplement during Pregnancy. ASDC J. Dent. Child. 1977, 44 (5), 391—395.
12. Ripa, L.W. A Critique of Topical Fluoride Methods (Dentifrices, Mouthrinses, Operator-and Self-Applied Gels) in an Era of Decreased Caries and Increased Fluorosis Prevalence. J. Public Health Dent. 1991, 51 (1), 23—41.
13. Ripa, L.W. Review of the Anticaries Effectiveness of Professionally Applied and Self-applied Topical Fluoride Gels. J. Public Health Dent. 1989, 49 (5), 297—309.
14. Segal, A.H.; Stiff, R.H.; George, W.A.; Picozzi, A. Cariostatic Effect of a Stannous Fluoride-Containing Dentifrice on Children: Two-Year Report of a Supervised Toothbrushing Study. J. Oral Ther. Pharmacol. 1967, 4 (3), 175—180.
15. Keyes, F.M.; Overton, J.J.; McKean, T.W. Clinical Trials of Caries Inhibiting Dentifrices. JADA 1961, 63, 189—193.
16. DePaola, P.F.; Soparkar, P.; Foley, S.; Bookstein, F.; Bakhos, Y. Effect of High-Concentration Ammonium and Sodium Fluoride Rinses on Dental Caries in School-Children. Commun. Dent. Oral Epidemiol. 1977, 5 (1), 7—14.
17. Reed, A.J.; Bibby, B.G. Preliminary Report on Effect of Topical Applications of Titanium Tetrafluoride on Dental Caries. J. Dent. Res. 1976, 55 (3), 357—358.
18. Koch, G. Long-term Study of Effect of Supervised Toothbrushing with a Sodium Fluoride Dentifrice. Caries Res. 1970, 4 (2), 149—157.
19. Koch, G. Comparison and Estimation of Effect on Caries of Daily Supervised Toothbrushing with a Dentifrice Containing Sodium Fluoride and a Dentifrice Containing Potassium Fluoride and Manganese Chloride. A Three-Year Clinical Test. Odontol. Rev. 1972, 23 (3), 341—354.
20. Peterson, J.K. A Supervised Brushing Trial of Sodium Monofluorophosphate Dentifrices in a Fluoridated Area. Caries Res. 1979, 13 (2), 68—72.
21. James, P.M.; Anderson, R.J.; Beal, J.F.; Bradnock, G. A 3-Year Clinical Trial of the Effect on Dental Caries of a Dentifrice Containing 2% Sodium Monofluorophosphate. Commun. Dent. Oral Epidemiol. 1977, 5 (2), 67—72.
22. Moller, I.J.; Holst, J.J.; Sørensen, E. Caries Reducing Effect of a Sodium Monofluorophosphate Dentifrice. Br. Dent. J. 1968, 124 (5), 209—213.
23. Gish, C.W.; Muhler, J.C.; Howell, C.L. Self Application of Fluoride as a Community Measure. J. Dent. Child. 1962, 29, 65—71.
24. Ripa, L.W.; Leske, G.S.; Sposato, A.; Varma, A. Effect of Prior Toothcleaning on Biannual Professional APF Topical Fluoride Gel-Tray Treatments. Results after Two Years. Clin. Prevent. Dent. 1983, 5 (4), 3—7.
25. Houpt, M.; Koenigsberg, S.; Shey, Z. The Effect of Prior Toothcleaning on the Efficacy of Topical Fluoride Treatment. Two-Year Results. Clin. Prevent. Dent. 1983, 5 (4), 8—10.
26. Brandt, R.S.; Slack, G.L.; Waller, D.F. The Use of a Sodium Fluoride Mouthwash in Reducing the Dental Caries Increment in Eleven-Year-Old English School Children. Proc. Br. Paedoc. Soc. 1972, 2, 23—25.
27. Rugg-Gunn, A.J.; Holloway, P.J.; Davies, T.G. Caries Prevention by Daily Fluoride Mouthrinsing. Report of a Three-Year Clinical Trial. Caries Br. Dent. J. 1973, 135 (8), 353—360.
28. Ripa, L.W.; Leske, G.S.; Sposato, A.L.; Rebich, T., Jr. Supervised Weekly Rinsing with a 0.2% Neutral NaF Solution; Results of a Demonstration Program after Four School Years. JADA 1981, 102 (4), 482—486.
29. Stephen, K.W. Fluoride Toothpastes, Rinses, and tablets. Adv. Dent. Res. 1994, 8 (2), 185—189.
30. Hunter, G.C., Jr.; Barringer, M.; Spooner, G. Analysis of Desensitization of Dentin by Sodium Silico-Fluoride and Gottlieb Solution. J. Periodontol. 1961, 32, 333—337.
31. Kanouse, M.C.; Ash, M.M., Jr.; Loe, H.; Schiott, C.R. The Effectiveness of a Sodium Monofluorophosphate Dentifrice on Dental Hypersensitivity. J. Periodontol. 1969, 40 (1), 38—40.
32. Loe, H.; Schiott, C.R. The Effect of Mouthrinses and Topical Application of Chlorhexidine on the Develop-



- ment of Dental Plaque and Gingivitis in Man. *J. Periodontol. Res.* 1970, 5 (2), 79—83.
33. Grossman, E.; Reiter, D.; Sturzenberger, O. P.; De la Rosa, M.; Dickinson, T. D.; Fenetti, G. A. Six Months Study of the Effects of a Chlorhexidine Mouthrinse on Gingivitis in Adults. *J. Periodontol. Res.* 1986, 16 (Suppl.), 33, 34.
 34. Segreto, V. A.; Collins, E. M.; Beiswanger, B. B.; De la Rosa, M.; Isaacs, R. L.; Lang, N. P. A Comparison of Mouthrinses Containing Two Concentrations of Chlorhexidine. *J. Periodontol. Res.* 1986, 21 (Suppl.), 23—32.
 35. Tinanoff, N.; Hock, J.; Camosci, D.; Helldén, L. Effect of Stannous Fluoride Mouthrinse on Dental Plaque Formation. *J. Clin. Periodontol.* 1980, 7 (3), 232—241.
 36. Tolle, S. L.; Bauman, D. B.; Allen, D. S. Effects of Fluoride Gels on Plaque and Gingival Health. *Dent. Hyg. (Chic.)* 1987, 61 (6), 280—284.
 37. Wolff, L. F.; Pihlstrom, B. L.; Bakdash, D. M.; et al. Program and Abstracts, International Association for Dental Research; Montreal Canada, March 1988, (abstract).
 38. Weitzman, S. A.; Weitberg, A. B.; Stossel, T. P.; Schwartz, J.; Shklar, G. Effects of Hydrogen Peroxide on Oral Carcinogenesis in Hamsters. *J. Periodontol.* 1986, 57 (11), 685—688.
 39. Rees, T. D.; Orth, C. F. Oral Ulcerations With Use of Hydrogen Peroxide. *J. Periodontol.* 1986, 57 (11), 689—692.
 40. Fornell, J.; Sundin, Y.; Lindhe, J. Effect of Listerine® on Dental Plaque and Gingivitis. *Scand. J. Dent. Res.* 1975, 83 (1), 18—25.
 41. Lamster, I. B.; Alfano, M. C.; Seiger, M. C. The Effect of Listerine® Antiseptic on Reduction of Existing Plaque and Gingivitis. *Clin. Prev. Dent.* 1983, 5, 12—16.
 42. Gordon, J. M.; Lamster, I. B.; Seiger, M. C. Efficacy of Listerine® Antiseptic in Inhibiting the Development of Plaque and Gingivitis. *J. Clin. Periodontol.* 1985, 12 (8), 697—704.
 43. Emling, R. C.; Yankell, S. L. First Clinical Studies of a New Prebrushing Mouthrinse. *Compend. Contin. Educ. Dent.* 1985, 6 (9), 636, 638—640, 644, 645.
 44. Ciancio, S. G.; Mather, M. L.; Bunnell, H. L. Clinical Evaluation of a Quaternary Ammonium-Containing Mouthrinse. *J. Periodontol.* 1975, 46 (7), 397—401.
 45. Sturzenberger, O. P.; Leonard, G. J. The Effect of a Mouthwash as Adjunct in Tooth Cleaning. *J. Periodontol.* 1969, 40 (5), 299—301.
 46. Lobene, R. R.; Lobene, S.; Soparkar, P. M. The Effect of a Cetylpyridinium Chloride Mouthwash on Human Plaque and Gingivitis. *J. Dent. Res. Prog. Abst.* 1977, 56, 595.
 47. Wennström, J.; Lindhe, J. Some Effects of a Sanguinarine Containing Mouthrinse on Developing Plaque and Gingivitis. *J. Clin. Periodontol.* 1985, 12 (10), 867—872.
 48. Klewansky, P.; Vernier, D. Sanguinarine and the Control of Plaque in Dental Practice. *Compend. Contin. Educ. Dent.*, S94—S97.
 49. Lobene, R. R.; Soparkar, P. M.; Newman, M. B. The Effects of a Sanguinaria Dentifrice on Plaque and Gingivitis. *Compend. Contin. Educ. Dent.* 1986, (Suppl. 7), S185—S188.
 50. Hanna, J. J.; Johnson, J. D.; Kufnec, M. M. Six Month Evaluation of Sanguinarine Products in Orthodontic Patients. Program and Abstracts, American Association of Dental Research; Montreal Canada, March 1988, (abstract).
 51. Elliott, J. R.; Bowers, G. M.; Clemmer, B. A.; Rovels-tad, G. H. A Comparison of Selected Oral Hygiene Devices in Dental Plaque Removal. *J. Periodontol.* 1972, 43 (4), 217—222.
 52. Brady, J. M.; Gray, W. A.; Bhaskar, S. N. Electron Microscopic Study of the Effect of Water Jet Lavage Devices on Dental Plaque. *J. Dent. Res.* 1973, 52 (6), 1310—1313.
 53. Ciancio, S. G. New Evidence that Oral Irrigation Reduces Proinflammatory Proteins—Cytokines. *Biological Therapies in Dentistry* 1999, 15, 15—16.
 54. Zacheral, W. A.; Pfeiffer, H. J.; Swancar, J. R. The Effect of Soluble Pyrophosphates on Dental Calculus in Adults. *JADA* 1985, 110 (5), 737, 738.
 55. Ciancio, S. G., Ed.; *ADA Guide to Dental Therapeutics*, 1st Ed.; American Dental Association: Chicago, 1999; 210—211.
 56. Ciancio, S. G. Tartar Reduction without Pyrophosphates. *Biological Therapies in Dentistry* 1998, (13).
 57. Pitts, G.; Brogdon, C.; Hu, L.; Masurat, T.; Painotti, R.; Schumann, P. Mechanism of Action of An Antiseptic, Anti-odor Mouthwash. *J. Dent. Res.* 1983, 62 (6), 738—742.
 58. Tonzetich, J.; McBride, B. C. Characterization of Volatile Sulphur Production by Pathogenic and Non-Pathogenic Strains of Oral Bacteroides. *Arch. Oral Biol.* 1981, 26, 963—969.
 59. Yaegaki, K.; Sanada, K. Volatile Sulphur Compounds in Mouth Air from Clinically Healthy Subjects and Patients with Periodontal Disease. *J. Periodontol. Res.* 1992, 27, 233—238.
 60. Gilman, A. G.; Goodman, L. S.; Gilman, A., Eds.

- Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed.; Macmillan; New York, 1996.
61. Cianco, S. G., Ed. ADA Guide to Dental Therapeutics, 1st Ed.; American Dental Association; Chicago, 1999; 4—15.
62. Ciancio, S. G. Dentinal Hypersensitivity. Endodont. Dental Traumatol. 1986, 12, 150—152.
63. Albers, H. F. Lightening Natural Teeth. ADEPT Report 1991, 2 (2), 1—24.
64. Haywood, V. B.; Leonard, R. H.; Nelson, C. F.; Brunson, W. D. Effectiveness, Side Effects and Long-Term Status of Nightguard Vital Bleaching. JADA 1994, 125 (9), 1219—1226.
65. Sreebny, L. M.; Valdini, A. Xerostomia: A Neglected Symptom. Arch. Intern. Med. 1987, 147, 133—137.
66. Sreebny, L. M.; Schwartz, S. S. A Reference Guide to Drugs and Dry Mouth. Gerontology 1986, 5, 189—192.
67. Butt, G. M. Drug-Induced Xerostomia. J. Can. Dent. Assoc. 1991, 57, 391—393.
68. Gordon, J. M.; Walker, C. B.; Murphy, C. J.; Goodson, J. M.; Socransky, S. S. Tetracycline: Levels Achievable in Gingival Crevice Fluid and In Vitro Effect on Subgingival Organisms. Part I. Concentrations in Crevicular Fluid after Repeated Doses. J. Periodontol. 1981, 52, 609—612.
69. Tonetti, M.; Cugini, A. M.; Goodson, J. M. Zero Order Delivery with Periodontol. Placement of Tetracycline Loaded Ethylene Vinyl Acetate Fibers. J. Periodontal. Res. 1990, 25, 243—247.
70. Walker, C. B.; Gordon, J. M.; McQuilkin, S. J.; Niebloom, T. A.; Socransky, S. S. Tetracycline: Levels Achievable in Gingival Crevice Fluid and In Vitro Effect on Subgingival Organisms. Part II. Susceptibilities of Periodontal Bacteria. J. Periodontol. 1981, 52, 613—616.
71. Newman, M. G.; Kornman, K. S.; Doherty, F. M. A 6-Month Multi-Center Evaluation of Adjunctive Tetracycline Fiber Therapy Used in Conjunction with Scaling and Root Planing in Maintenance Patients; Clinical Results. J. Periodontol. 1994, 65, 685—691.
72. Briner, W. W.; Kayrouz, G. A.; Chanak, M. X. Comparative Antimicrobial Effectiveness of a Substantive (0.12% Chlorhexidine) and a Nonsubstantive (Phenolic) Mouthrinse In Vivo and In Vitro. Comp. Contin. Educ. Dent. 1994, 15, 1158—1168.
73. Jeffcoat, M. K.; Bray, K. S.; Ciancio, S. G.; Dentino, A. R.; Fine, D. H.; Gordon, J. M.; Gunsolley, J. C.; Killoy, W. J.; Lowenguth, R. A.; Magnusson, N. L.; Offenbacher, S.; Palcanis, K. G.; Proskin, H. M.; Finkelman, R. D.; Flashner, M. Adjunctive Use of a Subgingival Controlled-Release Chlorhexidine Chip Reduces Probing Depth and Improves Attachment Level Compared With Scaling and Root Planing Alone. J. Periodontol. 1998, 69, 989—997.
74. Polson, A. M.; Southard, G. L.; Dunn, R. L.; Yewey, G. L.; Godowski, K. C.; Polson, A. P.; Fulfs, J. C.; Laster, L. Periodontal. Pocket Treatment in Beagle Dogs Using Subgingival Doxycycline from a Biodegradable System. I. Initial Clinical Responses. J. Periodontol. 1996, 67, 1176—1184.
75. Polson, A. M.; Garrett, S.; Stoller, N. H.; Bandt, C. L.; Hanes, P. J.; Killoy, W. J.; Southard, G. L.; Duke, S. P.; Bogle, G. D.; Drisko, C. H.; Friesen, L. R. Multi-Center Comparative Evaluation of Subgingivally Delivered Sanguinarine and Doxycycline in the Treatment of Periodontitis. II. Clinical Results. J. Periodontol. 1997, 68, 119—126.
76. Larsen, T. Occurrence of Doxycycline-Resistant Bacteria in the Oral Cavity After Local Administration of Doxycycline in Patients with Periodontal Disease. Scand. J. Infect. Dis. 1991, 23, 89—95.
77. Garrett, S.; Johnson, L.; Drisko, C. H.; Adams, D. F.; Bandt, C.; Beiswanger, B.; Bogle, G.; Donly, K.; Hallmon, W. W.; Hancock, E. B.; Hanes, P.; Hawley, C. E.; Kiger, R.; Killoy, W.; Mellonig, J. T.; Polson, A.; Raab, F. J.; Ryder, M.; Stoller, N. H.; Wang, H. L.; Wolinsky, L. E.; Evans, G. H.; Harold, C. Q.; Arnold, R. M.; Southard, G. L.; et al. Two Multi-Center Studies Evaluating Locally Delivered Doxycycline Hyclate, Placebo Control, Oral Hygiene, and Scaling and Root Planing in the Treatment of Periodontitis. J. Periodontol. 1999, 70, 490—503.
78. Ciancio, S.; Ashley, R. Safety and Efficacy of Sub-Antimicrobial-dose Doxycycline Therapy in Patients with Adult Periodontitis. Adv. Dent. Res. 1998, 12, 27—31.

(杨莉译)



研发密集的制药工业的经济特征

Douglas L. Cocks

Indiana University, Bloomington, Indiana, U. S. A.

引言

本章简单描述了研发密集的处方药制药工业的经济学，着重介绍了它的动态特点。这里所用的方法尽量避免使用静态分析，因而避免了使用纯的或完全竞争（perfect competition）。在这个理论讨论中，我们将引用某些经验研究来支持正在进行的理论研究。

这里所讨论的理论将集中讨论分配效率，但与所有有关分配效率的讨论一样，技术效率因素是自动涉及的，至少这些因素的内在意识是明显的。有关分配效率的内容将置于动态构架中；我们将尝试建立内含分析的和公共策略的“动态纯竞争”的概念。随着这个名词在工业组织上的应用，动态纯竞争的概念将描述一种可操作竞争的混合形式。

竞争过程的概述

在我们走近制药经济学理论大纲前，作为一种竞争过程，我们需要建立纯竞争概念。传统的微观经济学认为，“自然状态”是指一种用纯竞争来描述的状态。偏离这种自然状态，就会出现不平衡，这可能是由于垄断引起的，也可能是由于其他经常被引用的市场疏忽造成的。出现不平衡时，摸索（tatonnement）带我们进入纯竞争的平衡理想状态。有趣的是，纯竞争的模型从不真正描述摸索（平衡）的过程，而只是描述过程进行中的所需条件，以及当过程起效后的最终平衡。

由于“经济人”的本性使他（她）试图打破纯竞争的平衡，或者是摸索平衡过程，以及使他（她）与相对于世界其他经济体的经济地位最大化，垄断就发生了偏离。经济人会通过“准入壁垒”^[1a,1b]试图建立垄断地位。

根据传统的微观经济学，自然经济过程是从纯竞争平衡的自然状态进行的，或者是从满足发生纯竞争摸索过程所需条件的地方开始，直至形成垄断状态。

与此相关的竞争过程是指自然形成的垄断要全面地面对影响其地位的压力。这个过程是连续的，必须基于随时间的变化来考虑。回复到静止状态，重复福利损失的经济概念是社会机会的损失，与有新的企业、个人和公司通过提供新的和改进的产品及服务挑战原先的垄断地位有关。这又表现为经济的发展产生技术经济背景下的福利的获取，而不是为需要的人群提供公共的基金。一直以来，经济生活的特点就是连续地形成垄断和通过企业活动全面入侵的过程。这种企业活动包括观察获利机会并采取行动，其表

现为静态的垄断出租。

我们将动态纯竞争想象为一个过程，在此过程中，自然形成的垄断被系统性地侵蚀。它代表着一种能在现在和将来的商品和服务提供过程中合理地分配资源的熵。竞争过程的根本特征就是它已经意识到经济的不完美性是它的本质；经济人也意识到这是一种过程；他（她）愿意补偿能改良这些不完美的经济代理人。

制药工业竞争的经验特征

在 Cocks 和 Virts^[2,3] 的著作中对制药工业中的竞争问题有所阐述，Cocks 和 Virts 提到在各个药品市场和单个药品间价格明显地缺少刚性。但是 Brozen 给出的有关于此点的讨论最清楚^[3]：

Cocks 的资料也打破了对药品价格刚性的普遍幻想，以及对专利产品的无弹性要求的幻想。价格是明显有弹性的，因此价格在市场地位中有很大的影响。例如，在抗感染药物市场的领先产品中，1962~1971 年，价格降低量为 7%（产品 8）到 67%（产品 3）。在这些产品的通货膨胀时期，价格的平均下降为 32%，同时消费者消费指数就上升了 34%。以相同的美元购买力计算，抗感染药物的领先产品价格下降了 51%。这明显创了纪录。

这些产品的销售也说明了一般内科医生对自己所开处方中的药物价格是不太注意的这一观点是完全的幻想。抗感染药物产品 11 在上市后五年内市场份额为 0.1%，直到它的价格降低了 47%，它的市场份额上升到 0.7%，增长了 6 倍。该产品价格再下跌 14%，而它的销售额又上升了 170%。接下来三年中价格进一步下降 68%，使得其市场份额又上升了 12%。这些似乎显示了对于品牌专利产品需求的高价格弹性，尤其是从竞争产品的价格削减来看。

产品 3 从 1962 年到 1969 年其市场份额一直在减小，尽管它的价格一直在下跌，但是在 1970 年它的价格下降了 16% 后就不再下降，它的市场份额增加了 14%。1971 年价格进一步下降 27%，使它的市场份额上升了 40%。处方药市场对价格的变化也十分敏感，而关于处方医生对处方中药品价格不敏感的传说，相反，也是靠不住的。

尽管每个产品均有其特点，但是在每一类的产品中都是存在竞争的。一个产品在市场中有足够的特色能够使其在 5 年的时间里赢得 0.1% 的市场，那么当它的价格低于市场上其他大部分产品的价格时，它的市场份额会上升 310%。一种逐渐衰退的产品在采取类似的价格行动后，它会获得翻身，并会重新在市场中占有重要位置。

已经在经济理论中强调的一个领域就是，如果一家公

司或是一组公司能对不同的市场区域采用不同的价格体系,那么价格竞争就不存在。在制药工业中,这种“市场失败”在对老年人群的价格体系中已经强调过。这些公司认为老年人比其他人支付的费用更高,而最近由 Berndt 等所做的研究提供的统计学证据表明老年人并没有多支付费用。

Reekie 所做的研究提供了关于药品价格行为的更具系统性的分析^[3,4]。这项研究给出了强有力的统计学推论,即处方医生对药品价格的确是敏感的。该论文同样提供了有关药品价格弹性的统计学证据,经计算弹性系数大于 1。Schwartzman 提供了制药工业价格竞争数量的明显证据,尤其是在抗生素领域^[5]。老年人群一般比其他人群花费高,可是另外一些类别的药品他们却花费得较少^[6]。

制药公司的内在组织特征

迄今为止,我们所建立的制药公司模式让我们将公司基本上分成两个部分。两个部分分别是生产现有的已上市产品和通过研发生产新产品。这种现状自然而然地使我们提出疑问为何公司必须由这些看起来不同的部门构成。换句话说,为何会不存在只是研发和生产新产品的公司?该公司可以在开放的市场将这些新产品买给专门从事生产和销售由研究公司开发的产品的公司。在说明这个问题时,我们希望对于制药公司理论的微妙性能够观察得更为仔细。

关于为何有两个特征在经济上是有效的——现有产品的生产和新产品生产——出现在一个公司中,有两个基本元素:第一个元素与公司中共同的财政以及资源和现金流的使用有关。第二个元素是和公司中依靠市场所得的效率相关的(与传统微观经济学理论所想的外部市场是相反的)^[7a~7c]。从以下的讨论中明显可以了解这些元素是相互作用的。这些讨论也指出了在公司中企业的作用和对考虑公司效率的影响。

制药工业和其他研发密集的工业非常相似,就是在新产品、公司现金流、利润期望以及新药的高效特点之间存在相互关系。这种经济活动的流程可以描述如下:

- 产品一览表,包括
 - 过去研发形成的竞争产品,以形成、维持或提升现有产品和在研产品的期望值
 - 提高现金流(这与高获利率有关,在本章其他部分讨论)
 - 增加研发的投资
- 确定新药产品数
 - 产品一览表中包含以前的产品和新开发的产品

这一系列活动都是连续发生的,其主要特点是内部所产生的现金流,这种现金流提供了研发所需要的资金,及现有产品的收益一览表。为了提供必需的现金流,该一览表中必须包含有一定范围的价格边缘生产成本差别的产品。

刚才所讨论的两个因素之间的关联,可以通过对研发过程的主要方面——雇佣关系的考虑来进行详细说明。制药的研发是真正地通过雇用科学家和技术人员对人力资本

的投资与积累。像所有人力资本一样,它的“生产”必定体现在个人。不像普通的劳动力^[6]和其他任何与其相关的人力资本的特征(通过做而学),与制药研发相关的人力资本形成了监察和衡量工作努力的复杂性。如果使用外部市场,这些困难加重了合同中的意外条款,束缚了合理性,机会主义和信息碰撞问题就会比较普遍。分类系统的使用可以很明显地减少成本。除此之外,从上述的对研发过程的描述可以明显看出,内部市场组织允许将研发投入和产出相结合,产出将大于独立投入的产品的总和。

现在我们能阐明第三个因素的意义,即企业的组合因素。正如在有关革新的经济学的文献中讨论的,研发过程的六个阶段的确是说明了从发明到革新的各个步骤的特点。在这里企业的概念是很关键的。如果我们把企业作为一种经济梦想,它的重要性就会在第一个阶段表现特别明显。在这个阶段,所需要的不仅仅是科研能力,还需要一种把科学或知识转变成实用的产品的能力。然而,整个过程的每个阶段都需要企业的投入。

制药公司组合多种企业活动,组成了从发明到得到可上市药品的复杂过程。从本质上来说,我们认为有不同的研发投入:科学家和科学家-企业。在许多情况下,科学家并不具有完整的企业能力,而公司提供了实现这个目的的机制。除此之外,当我们涉及科学家和科学家-企业时,Williamson 概念的问题被弱化了^[8];资源被经济化,因为突发性合同条款、束缚的合理性、信息的碰撞和机会主义的复杂因素在科学家和科学家-企业是独立流行的。有可能 Williamson 特征有着不同的方面,这些特征是交互的,将困难调和,由此使得内部组织的资源消耗较少。

总之,制药研发过程的效率源于内部组织的这些活动。这个效率来源于研发过程中存在的复杂的技术环境。

我们试图应用于制药工业的理论的精髓由 Demsetz 清晰地描述出来了。关键点就是效率的获得,显然不是通过和理想的比较,而是把它们和“真实的世界”比较^[9]。

结论

这里所讨论的制药工业的经济学模型有四个基本假设:

(1) 对于新产品以及已存在的产品,药品的消费者具有价格敏感性,尤其是他们的处方医生。

(2) 研发是制药公司改变的主要催化剂,也是保证动态利益获得的企业活动的要点(由更高的利用率所抵消的静态利益损失的连续性,通过对老产品的价格压力,从新产品和对垄断力量的系统挑战产生利益)。通常有大量的公司从事研发活动。在 20 世纪 90 年代后期,人们尝试的业界大量合并可能会使一些公司的销售额达到了 1000 亿美元或更多。这些合并似乎是由于新药研发费用的明显增加造成的,可能会超过了 5 亿美元。

(3) 与现有的药物治疗效果相比,在治疗上很小的提高所带来的利益在理论上也能补偿新药价格上的差异(这是对假设 2 的推论)。

(4) 工业的经济收益性将反映所有的动态机会消耗, 也将通过时间走向正常回转。由此, 根据纯竞争模型, 经济收益性将作为最终的向导达到资源的合理分配。

本章的目的是将经济分析的某些方面应用在制药工业上。在应用的过程中, 我们已经描述动态竞争过程可以产生新产品, 也是现有产品生产过程中资源达到适当分配的一种机制。本章还提出了一种制药公司的模型。最后, 还讨论了竞争过程的收益和公司模型。

参考文献

- 1a. Schumpeter, J. A. *Capitalism, Socialism, and Democracy*; Harper & Row, Publishers, Inc.; New York, 1947.
- 1b. Winston, A. P. *The Chimera of Monopoly. The Competitive Economy*; Selected Readings; Brozen, Y., Ed.
2. Cocks, D. L.; Virts, J. R. Pricing Behavior in the Ethical Pharmaceutical Industry. *J. Bus.* 1977, 47, 349—362.
3. Cocks, D. L. *Product Innovation and the Dynamic Elements of Competition in the Ethical Pharmaceutical Industry. Drug Development and Marketing*; Helms, R. B., Ed.; American Enterprise Institute: Washington, D. C., 1975; 225—254.
4. Reekie, W. D. *Price and Quality Competition in the United States Drug Industry (Mimeographed). Pricing New Pharmaceutical Products*; Croom Helm; London, 1977.
5. Schwartzman, D. *Innovation in the Pharmaceutical Industry*; The Johns Hopkins University Press; Baltimore, 1976; 251—299.
6. Berndt is Price Inflation for the Elderly? An Empirical Analysis of Prescription Drugs. *Frontiers of Health Policy Research*; Garber, A., Ed.; National Bureau of Economic Research; Cambridge, MA, 1998.
- 7a. Coase, R. H. The Nature of the Firm. *Economica N. S.* 1937 November, 4, 386—405.
- 7b. Alchian, A.; Demsetz, H. Production, Information Costs, and Economic Organization. *Am. Eco. Rev.* 1972, 62, 777—795.
- 7c. Williamson, O. E. *Markets and Hierarchies: Analysis and Antitrust Implications*; The Free Press; New York, 1975; 183—192.
8. Williamson, O. E. *Markets and Hierarchies: Analysis and Antitrust Implications*; The Free Press; New York, 1975; 183—192.
9. Demsetz, H. Information and Efficiency: Another Viewpoint. *J. Law Eco.* April 1969, 1—2.

(卢文芸 译)





药代动力学：食物和禁食的影响

Rajesh Krishna

Bradford K. Jensen

Aventis Pharmaceuticals, Inc., Bridgewater, New Jersey, U. S. A.

引言

当服药与进餐时间相联系时，会改善患者的服药依从性。但有些药物受食物的种类、数量、进餐与服药相隔时间的影响，药代动力学（简称为药动学）性质会发生变化。食物对药代动力学可产生广泛的影响，包括促进药物吸收、延长药物达峰时间、增加药物暴露的可变性、减少药物的吸收、抑制代谢和排泄过程。很多时候这些变化可影响药物或药品的安全性和有效性，这是很不希望出现的。对批准上市的新药，说明书在用法与用量中告诫患者和医生该药物的峰浓度（ c_{max} ）、血药浓度-时间曲线下的面积（AUC）受进食影响的程度、可能的临床影响，并指导患者服药与进食的时间间隔。FDA 在 2001 年 10 月已对药厂颁布了一份生物药剂学研究指导原则草案，题为“食物影响生物利用度和进食状态生物等效性研究：试验设计、数据分析和说明书”。然而正式的指导原则至今仍未发布。

一系列内在和外在的因素影响药物在进食和禁食时的药代动力学性质，包括解剖学、病理学、生理学因素及药物的物理和化学性质、处方或赋形剂。由于食物对药物药动学、安全性、有效性影响的内在复杂性，在药物研发早期由制药企业评价食物影响，以利于设计临床疗效研究，最终结果在药品说明书中标明。本章将着重阐述在禁食和进食条件下影响药代动力学的因素以及在药物开发早期进行食物影响评价的重要性。还将为药品生产企业提供一些现有的模型，供其在药物研发过程中预测食物对药物的吸收、代谢、清除是否有影响以及影响的程度。虽然食物摄入对不同途径给药的药动学都有影响，但本章着重于口服给药。

食物对药代动力学的影响

食物对药物的动力学行为有多种影响（表 1），而与其治疗用途无关。主要的因素包括食物本身、食物组成、药物的种类及处方、同时服用的其他药物、一天的不同时段和疾病的病理学。这些变化常常是由食物引起的生理变化导致的。这些生理变化是：胃排空速度减慢、消化酶分泌的变化、胃肠道 pH 变化引起离子化药物解离动力学的变化、胆汁分泌的变化、肝或内脏血流的刺激等。其他重要的影响还包括食物成分与药物本身之间的物理相互作用，这种作用可影响药物的吸收或仅仅作为从消化道黏膜吸收

的屏障。图 1 是某一药物空腹时的药-时曲线，以及进食时是如何受食物影响（增加或减少）的例子。为了深入理解食物对药物药动学的影响，读者可参阅已出版的由 Welling、Fleisher、Singh 等写的权威综述^[1~5]。下面的讨论主要集中于在药物的开发中如何合理运用这些知识。举出在药物研发中的一些研究实例，探讨在药物开发早期确定食物的影响、何时进行该研究、试验如何设计、如何开展该项研究等问题，以及在药物开发这一特殊领域的其他问题和解决方法。

表 1 药代动力学受食物影响的部分药物

阿巴卡韦	CGP 43371	更昔洛韦	利福布汀
阿地唑仑	氯蒈膦酸盐	卤泛群	司他夫定
5-氨基水杨酸	环孢素	茚地那韦	他克林
阿托伐他汀	达那唑	伊曲康唑	亚叶酸
阿维曲普坦	去羟肌苷	左氧氟沙星	文拉法辛
溴西洋	红霉素	甲氨蝶呤	佐米曲普坦
布美他尼	非索非那定	硝苯地平	
塞来昔布	呋塞米	普伐他汀	

人体食物影响研究和现有的药动学方法学

食物的数量、种类、热量、脂肪含量，两餐间隔时间，胃内容积可以影响药物服用后所处的生理环境。导致药物生物利用度改变的因素有胆汁分泌和内脏血流改变、胃肠道 pH 改变、胃排空的延迟。为了研究生物利用度的这些变化，FDA 推荐了一个高脂肪、高热量膳食来试验进食对药动学的影响^[6]。这个膳食据称是食物-药物相互作用研究中最极端的。在美国申请新化学药品，必须进行以标准高脂饮食作为进食条件的严格控制的药动学研究。人们也许会提出：上述确定的标准高脂饮食并不代表美国或世界其他地方的标准早餐，如素食者的饮食，由美国糖尿病协会（ADA）推荐的糖尿病患者的低脂、低热量饮食，每个种族的特殊饮食等。所有这些差异以及药动学遗传倾向都很大程度地影响药物的药动学和用药习惯。虽然如此，将膳食维持不变（或不进食），人们可以评价某些变化因素（处方、相对于服药的进食时间等）对药动学的影响。要记住，膳食应能代表患者治疗期间的饮食或推荐的饮食。

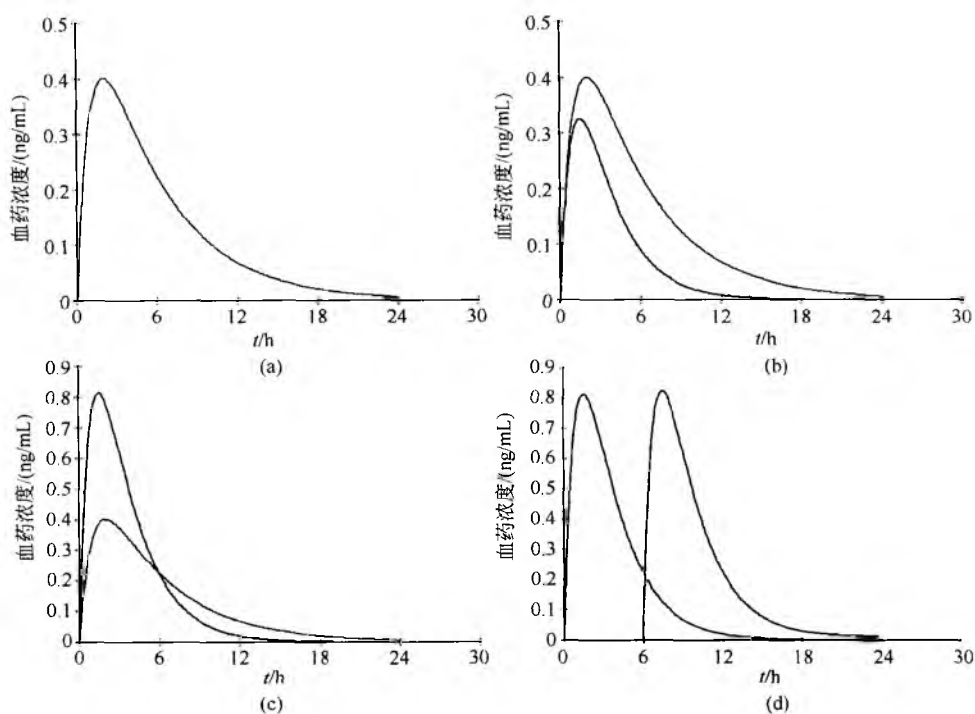


图1 (a) 药物 A 在禁食状态口服给药的药-时曲线; (b) 食物减少药物 A 的暴露 (c_{\max} 和 AUC); (c) 食物增加药物 A 的暴露 (c_{\max} 和 AUC); (d) 食物延迟但并不改变药物 A 的暴露 (c_{\max} 和 AUC)

在人体常进行两种类型的食物影响研究。设计这些试验用来推荐与食物同时服用的药物的剂量或提供食物对药代动力学影响的机理。前者的例子包括按 FDA 的指导原则所做的食物影响试验, 或称为标准评价法。后者的例子包括阐明机理的研究, 通过某些方法如 γ 闪烁扫描法、一同服用雷尼替丁调节胃的 pH 等方法来研究胃排空对药物生物利用度的影响。目的是提供或阐明观察到的食物影响的根本原因。

1. 标准食物影响评价——法规和产品说明书的考虑

标题为“食物影响生物利用度和进食状态生物等效性研究：试验设计、数据分析和说明书”的 FDA 指导原则草案为申办者提供合理试验设计的信息, 用来评价食物对药动学的影响, 以及在产品的说明书中提供合适的用量说明^[8]。如果要研究的药物属于生物药剂学分类系统 (BCS) 中的某一类^[6,7], 该指导原则提供有用的策略。如高溶解性和高渗透性的药物 (如 BCS 分类中的第一类), 药物的内在性质决定食物的影响在试验与参比药物之间差异很小。前提是这类化合物受食物影响的程度低, 吸收与 pH 和部位的关系小, 溶出无差异。

第一种用于评价食物对药物或药品药动学影响的试验设计包括单剂量、随机、均衡、两周期、两种给药方案 (进食和禁食) 交叉研究, 并在两次用药期间有一个足够的洗净期。试验的例数应满足统计学的要求, 能区分药物暴露参数 (c_{\max} 、 T_{\max} 和 AUC) 的微小变化。指导原则还要求

用最大规格 (该处强调不同规格的相同处方的药品, 进行研究时应选用最大规格的药品进行实验) 的制剂来进行该项研究。对禁食试验, 推荐在服药前至少禁食 10h, “受试者经过至少整夜 10h 的禁食后服用试验药品。服药后至少禁食 4h, 2h 后可以饮水。整个试验期间按时用标准餐。”关键不是服药前的禁食小时数, 而是胃的容积。禁食状态取决于胃上部的体积, 如果小于 50mL, 胃处于消化间歇状态。通常推荐服药后再禁食 4h。对进食组, 指导原则给出了一个标准高脂餐。该高脂餐由两个黄油煎的鸡蛋、两片火腿、两片涂黄油的土司、4oz 褐色土豆片和 8oz 的全脂奶组成。该饮食中大约 150kcal 来自蛋白质、250kcal 来自碳水化合物、600kcal 来自脂肪。采用非隔室模型的标准药动学方法计算 c_{\max} 、AUC、 T_{\max} 等参数。指导原则介绍这样将这些数据应用在产品说明书中。例如, 对 c_{\max} 或 AUC, 禁食与进食之间几何平均值之比的 90% 置信限落在 80% ~ 125% 的范围内^[8]。

经常发生的问题是在非美国地区, 如何提供 FDA 推荐的高脂肪饮食。在这些地区, 这些食物不易得到。用当地可得到的食品替代上述食物, 例如, 香肠代替火腿, 仍保持 FDA 推荐的高脂餐提供的热量是可以接受的。

第二种研究在群体药动学研究模式中加入食物这一变量因素^[9~11]。这是一个令人感兴趣的新领域, 得到管理局越来越多的关注。采用多水平人群药动学模型的优点是: 在大规模 III 期临床试验方案中采用多因素设计, 采用有限稀疏采样法, 既可以测定个体内部又可测定个体之间的变化程度。该方法允许同时分析相关的因素关系, 该关系是

正相关、负相关，还是指数相关，即分析受体表面积、年龄、体重、性别、血液或生化指标、清除率，更重要的，要分析由于摄入食物而引起的药物吸收延迟的变化对关键药动学参数的影响。这种分析可采用 NONMEM 工具，标准条件评估法（如一级、一级条件评估法以及相互作用的一级条件评估法等）。这可估算典型的关键药动学参数： V/F 、 CL/F 、吸收速率常数、迟滞时间。Shepard 等用带指示变量的连续取样法评价食物对感兴趣参数的影响^[11]。这些模型包括： $K_a = \theta_1(1-Q) + \theta_2 Q$ ，式中， Q 是指示变量，可以是 0（禁食）或 1（进食）， θ_1 和 θ_2 是感兴趣的参数， $K_a = \theta_1$ 为禁食处理， $K_a = \theta_2$ 为进食处理。

文献中一些新的例子描述了群体药动学方法在获得食物影响方面信息的强大作用，包括结合非隔室模型和群体药动学分析来回答科学问题。例如，Zhou 等用非隔室模型分析，测定药物在食物影响下生物利用度下降的程度。然后用反卷积法和随后的群体药动学分析来评价用餐时间对吸收的影响。在进食状态下，生物利用度的减少是吸收程度减少，而不是吸收率减少^[10]。在多中心临床试验中，以群体药动学方法评估食物影响。采用稀疏取样法和多分类连续方差法是这一方法更常规的应用。然而，没有传统的 I 期临床试验，还不清楚群体药动学是否能确切说明食物的相互作用。

2. 闪烁扫描评价方法

γ 闪烁扫描技术已被用来评估口服药物在进食和空腹状态下的生物药剂学特征，进而评估食物的影响。该方法尤其适合研究在进食状态放射性标记药物在胃肠道的转运。采用该方法，人们可以了解胃肠道处理食物的生理过程和胃是如何排空不同化学组成的食物的。这种类型的研究还可以揭示被研究药物通过胃肠道时潜在的吸收部位，以及在进食状态时是怎样影响药物吸收的。这些信息对设计缓控释制剂非常有用。在放射药动学中锝 (^{99m}Tc) 是一种广泛使用的放射性元素，因为它有合适的能量、较短的半衰期以及仅需小的放射剂量。要深入了解药物闪烁扫描法 (pharmacoscintigraphy)，读者可参考由 Wilding 等著的精彩综述^[12]。

评价食物对药代动力学影响的模型

1. 体外方法

文献报道采用生物相关溶出度模型来预测食物对药物吸收的影响^[13~17]。Peppas 等建议了几种溶出介质来模拟人的进食和空腹状态^[14~17]，它们分别用牛奶（3.5% 脂肪）以及含与不含胃蛋白酶的 USP 人工胃液作溶出介质来代表进食和空腹状态的胃。Dressman 和 Reppas 证实这些生物相关的介质在预测难溶性药物食物影响时有其独特的优势^[15]。图 2 显示了如何用溶出度试验来预计食物在体内是怎样对药物吸收产生影响的。这是 BCS 第二分类（高渗透

性、低水溶性药物）的药物达那唑。图 2(a) 是达那唑在不同介质中的溶出曲线，这些介质分别是水、人工肠液 (SIF)、FaSSIF 和 FeSSIF^[17]。FaSSIF 代表小肠的禁食状态，FeSSIF 代表小肠的进食状态。从这些溶出曲线可清楚地看到：在模拟的进食状态，溶出度比禁食状态大，体外溶出增加的程度与达那唑在人体进食状态时人体暴露增加的程度相似，如图 2(b) 所示^[18]。食物影响的机制与胆汁盐增加类固醇药物溶解度有关^[15]。这种方法仅能用来预测属于 BCS 第二类的药物而不能用于其他类型的药物。

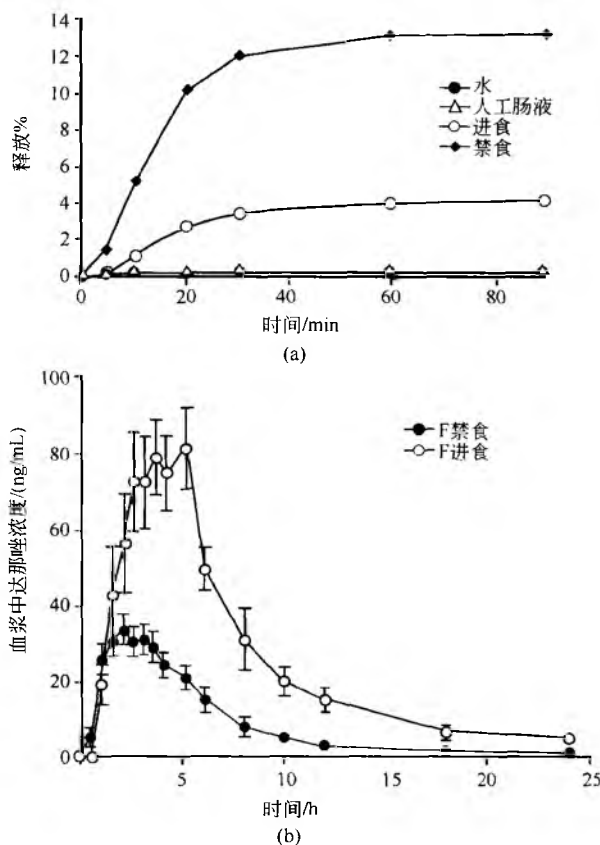


图 2 达那唑在不同介质中的体外溶出曲线 (a)^[17]和达那唑体内血浆浓度-时间曲线 (b)^[18]

2. 体内方法

一些动物模型被用来描述禁食和进食状态时的药代动力学，并用来预测在人体内的行为。这些动物有小鼠、大鼠、兔、豚鼠、犬、猪、猴等。下面将讨论啮齿动物、犬和猪作为动物模型预测人体药动学行为的相对优点、缺点。必须记住动物模型对评价食物对口服生物利用度的明显影响是十分有用的，但一些对人体研究和治疗很重要的相对较小的差异可能不被发现。

2.1 啮齿动物

通常不推荐用啮齿动物（小鼠、大鼠、豚鼠）来评价食物影响，有这样几个原因：胃肠道的解剖和生理学不同、



进食人类的食物较困难，不可能进行自身交叉试验。啮齿动物与人类和非人类灵长动物在药动学和代谢行为上的差异，使得在这种情况下用啮齿动物评价是无效的。研究药物在动物模型上的代谢特征，可以说明该类动物能否作为研究人体药动学行为的预试验。此外，像小鼠这样的小啮齿动物因不能连续采样而受到限制。然而，在药物的开发中，啮齿动物是两种通常用来进行药物毒性试验的动物模型之一。评价食物影响的重要性不仅在于预测人体食物的影响，更多的是出于毒动学考虑确保合适的多次暴露。有少数研究者的试验以大鼠为模型预测食物影响行为^[19~21]。

2.2 犬

已证明五肽促胃酸激素预处理犬在研究新剂型的生物药剂学特性时非常有用。利用犬做实验动物，可方便地进行自身交叉设计、人的食物可以方便地给这些动物吃，因此，犬是最常用来评价药代动力学的动物模型之一^[22,23]。犬模型的缺点是胃肠道生理与人不相似，产生与未经五肽促胃酸激素预处理犬药动学行为有差异，必须用五肽促胃酸激素和其他生理试剂调节胃肠道生理环境。另外，对于某些化合物，犬与人类的药物代谢与转运不相似。此外，犬对某些药剂学上常用的难溶性药物增溶辅料更加敏感，例如，聚山梨酯引起的直立性低血压。

虽然犬和人在禁食状态下胃排空时间相似，但犬的肠通过时间几乎是人的两倍^[24]。这些明显的差异可通过给予犬五肽促胃酸激素进行预处理来抵消，五肽促胃酸激素可使犬胃的酸度、排空时间和小肠通过时间尽量接近人的条件，大致分别为 pH 2、0.7h 和 4h^[25]。另外一个模拟人胃环境的方法是同时给犬肌肉注射五肽促胃酸激素及静脉注射硫酸阿托品^[26]。

五肽促胃酸激素是胃泌素的类似物，可刺激胃酸分泌，通常以 6~10 μ g/kg 的剂量在生物药剂学试验前肌肉注射给药。在用经这样预处理的犬进行药物研究的文献中，自相矛盾的结果已使这一模型不可能广泛使用。例如，与未处理的犬相比，五肽促胃酸激素预处理的犬预测去羟肌苷的人体生物利用度的效果更好^[22]。与此相反，Kanerva 等的研究数据表明五肽促胃酸激素预处理犬不能可靠地预测酸不稳定药物德伦环烷的吸收^[27]。

用犬进行的食物影响试验的典型设计如下：Beagle 犬（通常 $n=6\sim8$ ）以随机或非随机交叉设计单次给予一个剂量的药品（硬胶囊或片剂）。给药的方式为空腹过夜后（禁食状态）、低脂饮食、高脂饮食或其他特殊饮食后给药。喂给犬的食物组成可以显著不同。例如，Paulson 等给予犬低、中和高脂肪含量的食物^[23]。低脂食物由一片涂 0.5oz 果冻的白吐司面包、8oz 脱脂牛奶和 6oz 橘汁组成。中脂食物由一片分别涂 0.5oz 花生黄油和相同质量果冻的白吐司面包、1oz 干谷物（脆玉米片）、8oz 脱脂牛奶、6oz 橘汁和 1 只香蕉组成。高脂饮食由两片涂 1.2oz 黄油的白吐司面包、两只黄油煎蛋、两片熟火腿、2oz 黄油煎的棕色土豆片和 8oz 全脂奶组成。这些食物被匀浆后或放在碗里给犬食

用或给犬灌胃。在用药周期间要有适当长的洗净期。在给药前和给药后的预计时间点采取血样用来评价禁食和进食状态的药动学行为。

2.3 猪和小型猪

小型猪的消化道与成人的消化道在解剖学和生理学上相似。事实上，刚断奶小型猪模型的胃肠道与 2~5 岁儿童的胃肠道十分相似^[28,29]。特别是在胃绒毛、胃分泌物的调节和组成、通行时间以及消化和吸收行为上相似^[30~34]。除此优势之外，在药动学评价中较少使用小型猪。用小型猪评价食物影响的一个例子是不同脂肪含量的食物对单剂量服用 400mg 茶碱的生物利用度影响研究^[35]。Koritz 等在猪和人之间得到相似的药动学结果，因此建议用猪作为评价茶碱人体生物等效性的动物预测模型^[36]。

在药物开发中评价食物影响需考虑的关键因素

1. 食物影响研究的时间选择

在药物研发过程中通常有两种类型的临床药动/药效学（PK/PD）研究（表 2）：一种是“前期”研究，获得某一待研究化合物的初步评价以做一些内部决策；另一种是较正式的有统计意义的“关键”研究，该研究用来提供药品说明书的推荐剂量。两种研究的主要差别是“前期”研究常关注大的差异，而“关键”研究则关注预先确定的终点的小差异。“前期”研究常用于已开发的处方和估计的治疗剂量，可以为设计良好的“关键”研究提供有价值的信息。药品说明书所要求的食物影响评价通常在药物研发后期进行，尤其是当上市的处方已确定及已从 III 期有效性研究中获得了治疗剂量后。FDA 的企业指南中有如何进行这类研究的建议。

表 2 在药物开发早期进行的典型临床药理学与 PK/PD 研究

I	临床药理学研究
	单次给药剂量递增的安全性、PK 和 PD 研究
	多次给药剂量递增的安全性、PK 和 PD 研究
	作用机制验证研究
	作用原理验证研究
II	临床 PK/PD 研究
	不同年龄、性别 PK 研究
	药物-药物相互作用
	肝、肾功能不全的 PK
	BA/BE 进食和空腹时的 PK
	剂量比例性和日变化
	单剂量和多剂量 PK/PD
	¹⁴ C ADME 研究
	组织分布（PET、 γ 闪烁扫描法等）PK

在药物研发过程中探索食物对某一新化合物药动学的

影响试验在不同公司之间是有差异的。这由市场因素、竞争优势、剂量的可变性和已知的治疗指数来确定。一些研究者建议在研发早期应有探索性评价,从而对那些食物会产生不良影响的药物进行合适的处方筛选^[37,38]。但要小心,如果制剂的处方或辅料有变化,需要进行大量的食物影响试验。因而在项目进行过程中需要多次调整处方时,应暂缓进行食物影响评价,只把处方作为一个变量。

一个检验食物影响的简单方法是一旦药物的最大耐受量(MTD)确定后,把食物影响评价试验作为 first-in-man (首先在人, FIM) 研究的一部分。根据药物在动物体内的生物利用度特性、药物的理化性质和该药物是否是溶出度限制性吸收的初步数据,可以用 MTD 的 1/2 和 1/4 作为初步食物影响评价试验的起始剂量。当药物还没有充足的安全性数据时,这个方法避免不必要的药物高暴露。剂量选择还依赖于预计的与治疗有关的剂量范围、是否为线性药动学行为和生物分析的灵敏度。FIM 研究的典型设计包括在 8 个受试者(6 个药物、2 个安慰剂)中非随机、非交叉、单次给药,剂量递增至 MTD。通常在空腹一夜后给药。例如,在食物影响试验中,经过一个洗净期后,在标准高脂饮食后分别给予 0.25~0.5MTD 剂量。这可以比较受试者体内有、无食物情况下药物的暴露,但不能说明周期效应。因此,这种设计通常不能得到结论性的结果。为了得到食物影响评价的科学结果,建议将食物影响试验作为 FIM 试验的一部分,在 8 个受试者中采取随机交叉试验设计。

总之,建议进行特定的、设计良好的食物影响研究,变量具有较大的差别,以捕捉有意义的药物暴露变化。

2. 单剂量与多剂量给药——剂量选择

在评价食物对药动学的影响试验中,选择一个合适的剂量是非常重要的。剂量选择取决于以下几个因素:与治疗相关的浓度(如果已知的话)、安全范围、是否为线性药代动力学等。对于这类评价试验,通常需要指定一个药物的单次给药量。然而,对于非线性药动学的药物或多次给药药物产生累积或诱导,多剂量给药研究是一个更好的选择。如果首要的或次要的目的是评估食物作用对安全性或有效性的影响,多剂量给药研究可以更有意义。因为单剂量给药药效不足以产生有意义的波动。采用这种方法的一个例子是多剂量服用他汀类抗高血脂药,以评价食物对降脂效应的影响,即低密度脂蛋白-胆固醇水平(LDL-C)。结果 LDL-C 水平反弹速率减慢。

2.1 依赖药动学特性选择剂量

某些高渗透性、低水溶性、在禁食状态下口服生物利用度低的药物,其口服吸收受高脂食物影响很大。选择这类药物的剂量是富有挑战性和重要的。例如,阿维 A 是维生素 A 药物,用来治疗牛皮癣。根据阿维 A 所使用的剂量,摄入食物后其吸收的增加值不同。图 3 (a) 和 (b) 是进食与禁食状态时,剂量与 C_{max} 、AUC 的关系图。在禁食

状态下,剂量达到 50mg 时, C_{max} 、AUC 即达到平台,剂量高于 50mg 时 C_{max} 、AUC 的增加很小。与之相比,当药物与高脂食物同服时,在试验的高达 100mg 的剂量范围内 C_{max} 和 AUC 几乎是与剂量成比例增加的^[39]。当阿维 A 与食物同服时,受试者之间的暴露参数差异减小。这些结果对溶出速率限制吸收的药物有重要意义。在药物研发时,如果安全性没问题以及制剂处方尚可优化,就有机会通过处方筛选提高药物的生物利用度。这个例子还说明需要在药物研发早期即进行食物作用评价研究。在阿维 A 的 III 期临床试验中,要求患者在每日进餐时服药就是基于这些资料。

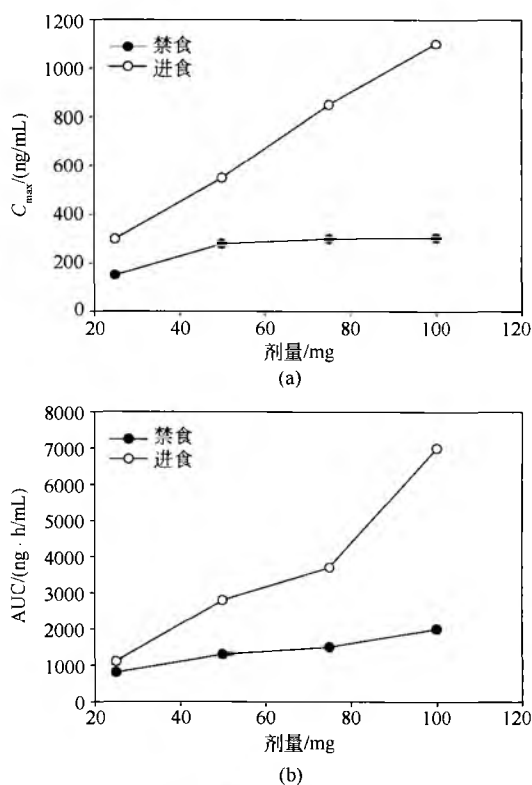


图3 阿维 A 剂量与 C_{max} 关系 (a) 和阿维 A 剂量与 AUC 关系 (b)^[39]

2.2 依据 PK-PD 关系选择剂量

剂量选择第二个要考虑的因素是 PK-PD 关系。依据 PK-PD 曲线上的参考点,食物对 PK、PD 或两者产生很大影响或几乎不产生影响(图 4)。例如,药物 A 受食物的影响, C_{max} 和 AUC 显著减小,但血压降低受的影响相对较小。可以想象,当 PK 大的差异导致 PD 较小的变化时,药物的 PD 是具最大效应的。另外,如果药物 B 的剂量选择在 PD 最大效应的 50%,那么在药物暴露过程中将产生大得多的 PD 差异。

前者(药物 A 行为)可由普伐他汀 PK 和 PD 受食物影响为例说明。虽然低脂、低胆固醇饮食显著地改变 20mg 普伐他汀的药动学,但未得到不利的药效学影响(降脂功

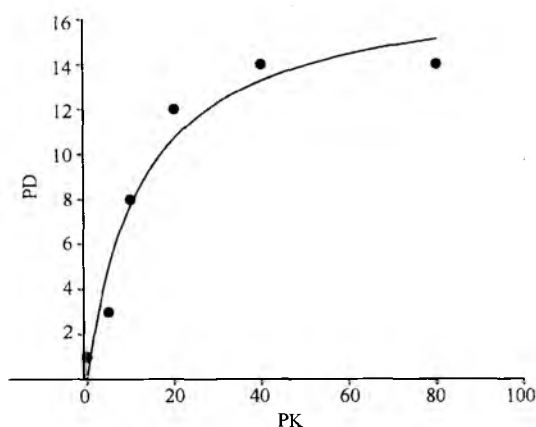


图4 假想药物的 PK-PD 关系

效)^[40]。同时进食使普伐他汀的 C_{max} 减小 49%，AUC 减小 31%，但 LDL-C 降低效应变化很小，与食物同服时为 -37%，饭前 1h 为 -36%。作者建议服用普伐他汀不必考虑食物的影响。值得注意的是普伐他汀的 LDL-C 降低效应平台在 -32% (20mg) ~ -37% (80mg) 变化，在 -37% 时，此时 PD 已处在 S 形 PK-PD 曲线的平台部分 (图 4)^[41]。结果是即使 PK 变化 50%，PD 的影响仍很小。如果某些药物的 PD 在 PK-PD 曲线的平台部分，其 PD 受食物的影响将不会很大。如果选择剂量使 PD 为最大值的 0.5 倍，这时随着 PK 的变化，PD 有很大的变化。

3. 食物的种类

另一个进行食物影响研究要考虑的关键问题是用来评价食物对药动学影响的食物种类。因为在世界范围内，不同种族、不同地区人们饮食习惯不同，可以想象“标准”早餐、中餐和晚餐实际是完全不同的。那么评价食物对 PK-PD 的确切影响并进行全球剂量推荐就变得困难了。

为了在药代动力学研究中提供评估食物影响的方法学基础，FAD 起草了一个指导原则草案以推荐标准的高脂饮食。该标准的高脂饮食由“2 只黄油煎蛋、2 片火腿、2 片涂黄油的土司、4oz 棕色土豆片和 8oz 全脂奶”组成。药动学行为的差异可能取决于所用早餐的种类。例如，英国早餐在组成和热量上与美国的早餐、与美国糖尿病协会推荐的特殊饮食是不一样的。在这样的情况下，为了获取不同种类食物有意义的数，食物常以碳水化合物、蛋白质、脂肪含量分为“高脂”、“低脂”、“高蛋白质”或“高碳水化合物”饮食。另外一种分类按食物本身的热量分为“低热量”和“高热量”。Colburn 等研究了不同组成的早餐、固体和液体（全脂奶）饮食对阿维 A 酯药动学的影响^[42]。药物在空腹或进食时给予，给予饮食为标准高脂早餐、标准高碳水化合物早餐和全脂奶 (454g)。给予高脂早餐和全脂奶时的血浆阿维 A 酯浓度高于禁食时和给予高碳水化合物饮食时的血浆浓度。饮食脂肪含量的变化由于改变生理学环境还能影响药物的吸收和分布。已知大量的脂肪可抑制胃排空。此外，固体和液体食物的胃肠道转运时间不同，

这可以影响药物的药动学行为。表 3 是影响药物吸收、代谢和排泄的部分食物组成目录。由于文献中各研究给予的饮食不一致，除非这些组成差异是在同一项研究中，这些数据是不能比较的。

表3 部分影响药物吸收、代谢和排泄的部分食物成分目录

高脂含量的产品	红酒
果汁	黑胡椒粉
橘汁	茶
柚子汁	大蒜
苹果汁	椰菜

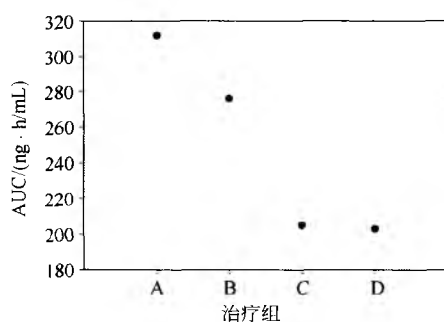
食物影响药物吸收的更重要的因素是毛细管系统的血流速率。取决于被摄取食物的组成，食物可引起内脏血流加快，导致药物吸收的改变。与该原理紧密联系的是当药物通过门循环经过肝脏时，药物被首过效应代谢的程度。饮食的种类和数量都能影响内脏血流。Walmsley 等用非损伤的放射胶体成像技术研究肝血液动力学，用于评价食物对肝、肠系膜、脾脏动脉有效血流的影响^[43]。结果进食后有效肝血流、肠系膜动脉有效血流增加 28%~69%。已知长链脂肪酸刺激人的肠血流^[44]。

越来越多的证据证明食物或食物中的某些组分通过抑制细胞色素 P450 酶或调制药物转运体（如 p-糖蛋白）而影响药物的代谢和清除^[45~53]。这些成分包括蔬菜、水果及某些组分，如 St. John's 麦芽汁，微生物，柚子汁，某些橘汁，苹果汁，红、黑或白胡椒粉^[45~53]。红酒和绿茶也含有能改变药物代谢/清除的成分。为了区分这些影响和胃肠道生理环境改变的影响，药物开发计划需分别进行食物和代谢-转运体相互作用的研究，以全面评估对剂量推荐的影响。

4. 用餐时间与剂量关系

对于药动学受食物影响较大的化合物来说，进食时间与用药的时间间隔有重要的影响。食物对药动学影响的程度受进食与服药间隔时间的影响。随着进食与服药间隔时间的增加，食物对药动学的影响将减小。来看下面的例子。如果某人固定摄入的食物而改变进餐的时间，可以观察到药物吸收速率和程度有差异。图 5 是单次口服 5mg 他克莫司 AUC 与进食时间的关系图^[54]。各组情况分别是：A. 10h 禁食；B. 早餐前 1h 服药；C. 早餐后立即服药；D. 开始进食早餐后 1.5h 服药。正如所期望的，在禁食状态时他克莫司吸收最大^[54]。在进食前 1h 服药对生物利用度的影响最小，进食后立即服用他克莫司影响最大（C 组和 D 组）。

Marathe 等在阿维曲普坦研发过程中系统地研究了食物对阿维曲普坦药动学的影响。在起初的研究中，他们发现了与食物同服显著降低阿维曲普坦的生物利用度^[55]。当 50mg 阿维曲普坦胶囊在标准高脂饮食 5min 后给予，平均 C_{max} 和 AUC 分别降低 70% 与 45%，而 T_{max} 延迟 45min~2h。因为阿维曲普坦被用来治疗偏头痛，食物影响对这类

图5 用餐时间与药物 AUC 的关系^[54]

适应证的药物开发有重要意义。在第二阶段的研究中, Marathe 等设计了一个进食时间研究, 在禁食过夜后分别在标准高脂餐后 0.5h、1h、2h 和 4h 后给予阿维曲普坦^[56]。阿维曲普坦生物利用度与进食与服药间隔时间有密切的关系, 随着间隔时间增加食物的影响减小。餐后 0.5h、1h、2h 和 4h 平均 C_{max} 分别减小 61%、58%、50% 和 35%, AUC 分别减小 35%、31%、34% 和 19%。 T_{max} 均值分别为 0.5h (禁食)、1.5h (进食后 0.5h 和 1h)、1.25h (进食后 2h) 和 0.75h (进食后 4h)。在同一研究者的后期研究中, 闪烁法分析表明阿维曲普坦在胃排空后在小肠上端被快速吸收^[57]。在进食状态下胃排空缓慢而连续, 导致吸收延缓。研究者还认为 C_{max} 和 AUC 个体之间差异大是由于在禁食和进食时胃排空差异引起的。

进食时间对二磷酸酯药物氯磷酸生物利用度的影响, Laitinen 等也有类似的报道^[58]。当氯磷酸在餐前 2h 服用时, 药物暴露 (AUC) 最大, 随后依次是餐前 1h (为餐前 2h AUC 的 91%), 餐前 0.5h (为餐前 2h AUC 的 69%)、与食物同服 (为餐前 2h AUC 的 10%) 和餐后 2h (为餐前 2h AUC 的 34%)。虽然餐前 2h 不是“真正”的空腹状态, 但餐前、餐后短间隔内药物的生物利用度有可测得到的差异, 使得研究者得出氯磷酸必须在餐前 0.5h 服用的结论。这个处方规定的服药与进食的间隔时间既可保证患者的依从性, 又将对药物吸收的影响降至最小的可接受的范围。

对治疗窗大的药物, 进食时间对药物吸收的这些变化在临床上是不需引起注意的, 但对治疗窗小的药物应引起注意。

5. 制剂种类

制剂的种类、制剂中所含的辅料以及药物颗粒的大小都可以影响药物的吸收, 这些影响可与食物的影响相混淆^[59-63]。例如, 一个高水溶性的药物可用难溶于水的高分子辅料制成片剂, 这种辅料可影响药物从基质中的释放, 进而影响片剂的溶出特性。某些亲水高分子 (如羟丙基甲基纤维素) 用于缓释或控释剂型, 食物会引起药物的突释。制剂所用的不同辅料是常常造成食物影响数据自相矛盾的原因。因此, 一些辅料如甘露醇由于改变通行时间而影响药物的吸收; 另一些如 PEG 300、Cremophor EL、聚山梨

酯-80 抑制糖蛋白和其他药物转运体^[59,60,63]。

在药物研发过程中, 为了适时满足临床药理学和 PK/PD 研究的要求, 常需要根据药物研发的不同阶段和现有的原料药改变剂型。例如, 一个剂型可以先从混悬水溶液开始 FIM 研究, 再到验证概念研究中的胶囊剂, 最后以片剂上市。为了使Ⅲ期临床试验得到最佳设计, 每一次改变剂型都需要进行新的食物影响试验, 来评价改变的剂型对已取得的食物影响结果是否有影响。为了减少由于剂型改变而需进行的食物影响试验的次数, 必须在药物的研发过程中保持一致的制剂。使用的辅料必须满足包括制剂学、临床药理学、临床 PK/PD 和药物安全性等多个领域的要求。一个关键的食物影响研究需用Ⅲ期临床疗效试验的制剂或上市制剂来进行, 这样可以提供与食物相关的剂量推荐。

6. 药物吸收的部位

药物从消化道吸收非常明显地依赖于药物的内在性质。例如, 一种药物可在消化道上部或整个消化道吸收。这将对评估食物影响, 开发改良释放的制剂, 或证明试验制剂与参比制剂生物等效有重要意义。对一种吸收窗在消化道上部的药物来说, 由于食物而产生的 T_{max} 延迟将导致吸收不完全。

结论

很明显, 食物对药物的药动学和药效学有很大影响。虽然在本章未讨论, 但食物也可对药品的有效性和安全性产生不利的影响。不断增加的文献指出, 很多在药品研发过程中常用的药用辅料通过改变药物的代谢和消除特性影响药物的处置。不管是将食物影响的结果用于公司内部决策和可开发性考虑, 还是用于最终上市处方的剂量推荐, 在药物开发中, 理解食物影响的多样性和复杂性是至关重要的。设计良好及例数足够的临床试验, 将为药物学家在以下方面提供重要的线索: ①能够很好地设计以后的临床药效学试验; ②在药物研发的早期和中期优化处方; ③向临床医生提供即将上市产品患者最易接受的处方选择。

参考文献

1. Welling, P. G. Influence of food and diet on gastrointestinal drug absorption: A review. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 1977, 5 (4), 291-334.
2. Welling, P. G. Interactions affecting drug absorption. *Clin. Pharmacokinet.* 1984, 9 (5), 404-434.
3. Welling, P. G. Effects of food on drug absorption. *Pharmacol. Ther.* 1989, 43 (3), 425-441.
4. Fleisher, D.; Li, C.; Zhou, Y.; Pao, L. H.; Karim, A. Drug, meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. Clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 1999, 36 (3), 233-254.

5. Singh, B. N. Effects of food on clinical pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* 1999, 37 (3), 213–255.
6. Lobenberg, R.; Amidon, G. L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000, 50 (1), 3–12.
7. Amidon, G. L.; Lennernas, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 1995, 12 (3), 413–420.
8. Food-Effect Bioavailability and Fed Bioequivalence Studies: Study Design, Data Analysis, and Labeling. In Draft Guidance for Industry; U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, October 2001.
9. Jorga, K.; Fotteler, B.; Banken, L.; Snell, P.; Steimer, J. L. Population pharmacokinetics of tolcapone in parkinsonian patients in dose finding studies. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2000, 49 (1), 39–48.
10. Zhou, H.; Khalilieh, S.; Lau, H.; Guerret, M.; Osborne, S.; Alladina, L.; Laurent, A. L.; McLeod, J. F. Effect of meal timing not critical for the pharmacokinetics of tegaserod (HTF 919). *J. Clin. Pharmacol.* 1999, 39 (9), 911–919.
11. Shepard, D. R.; Mani, S.; Kastrissios, H.; Learned-Coughlin, S.; Smith, D.; Ertel, P.; Magnum, S.; Janisch, L.; Fleming, G. F.; Schilsky, R. L.; Ratain, M. J. Estimation of the effect of food on the disposition of oral 5-fluorouracil in combination with eniluracil. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2002, 49 (5), 398–402.
12. Wilding, I. R.; Coupe, A. J.; Davis, S. S. The role of gammascintigraphy in oral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, 46 (1–3), 103–124.
13. Charman, W. N.; Porter, C. J.; Mithani, S.; Dressman, J. B. Physiochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: The role of lipids and pH. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86 (3), 269–282.
14. Nicolaidis, E.; Svmillides, M.; Dressman, J. B.; Reppas, C. Biorelevant dissolution testing to predict the plasma profile of lipophilic drugs after oral administration. *Pharm. Res.* 2001, 18 (3), 380–388.
15. Dressman, J. B.; Reppas, C. In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000, (Suppl 2), S73–S80.
16. Nicolaidis, E.; Galia, E.; Ethymiopoulos, C.; Dressman, J. B.; Reppas, C. Forecasting the in vivo performance of four low solubility drugs from their in vitro dissolution data. *Pharm. Res.* 1999, 16 (12), 1876–1882.
17. Galia, E.; Nicolaidis, E.; Horter, D.; Lobenberg, R.; Reppas, C.; Dressman, J. B. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharm. Res.* 1998, 15 (5), 698–705.
18. Charman, W. N.; Rogge, M. C.; Boddy, A. W.; Barr, W. H.; Berger, B. M. Absorption of danazol after administration to different sites of the gastrointestinal tract and the relationship to single and double peak phenomena in the plasma profiles. *J. Clin. Pharmacol.* 1993, 33, 1207–1213.
19. Lee, K. H.; Xu, G. X.; Schoenhard, G. L.; Cook, C. S. Mechanisms of food effects of structurally related antiarrhythmic drugs, disopyramide and bidisomide in the rat. *Pharm. Res.* 1997, 14 (8), 1030–1038.
20. Cook, C. S.; Zhang, L.; Osis, J.; Schoenhard, G. L.; Karim, A. Mechanism of compound-and species-specific food effects of structurally related antiarrhythmic drugs, disopyramide and bidisomide. *Pharm. Res.* 1998, 15 (3), 429–433.
21. Pao, L. H.; Zhou, S. Y.; Cook, C.; Kararli, T.; Kirchhoff, C.; Truelove, J.; Karim, A.; Fleisher, D. Reduced systemic availability of an antiarrhythmic drug, bidisomide, with meal co-administration; Relationship with region-dependent intestinal absorption. *Pharm. Res.* 1998, 15 (2), 221–227.
22. Knupp, C. A.; Shyu, W. C.; Morgenthien, E. A.; Lee, J. S.; Barbhuiya, R. H. Biopharmaceutics of didanosine in humans and in a model for acid-labile drugs, the pentagastrin-pretreated dog. *Pharm. Res.* 1993, 10 (8), 1157–1164.
23. Paulson, S. K.; Vaughn, M. B.; Jessen, S. M.; Lawal, Y.; Gresk, C. J.; Yan, B.; Maziasz, T. J.; Cook, C. S.; Karim, A. Pharmacokinetics of celecoxib after oral administration in dogs and humans; Effect of food and site of absorption. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, 297 (2), 638–645.
24. Lui, C. Y.; Amidon, G. L.; Berardi, R. R.; Fleisher, D.; Youngberg, C.; Dressman, J. B. Comparison of gastrointestinal pH in dogs and humans; implications on the use of the beagle dog as a model for oral absorption in humans. *J. Pharm. Sci.* 1986, 75 (3), 271–274.
25. Sagara, K.; Nagamatsu, Y.; Yamada, I.; Kavata, M.; Mizuta, H.; Ogawa, K. Bioavailability study of commercial sustained-release preparations of diclofenac sodium in gastrointestinal physiology regulated-dogs. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 1992, 40 (12), 3303–3306.
26. Sagara, K.; Kawata, M.; Mizuta, H.; Shibata, M. Utility of gastrointestinal physiology regulated-dogs: Bioavailability study of a commercial sustained-release

dosage form of theophylline. *Biol. Pharm. Bull.* 1994, 17 (7), 931–934.

27. Kanerva, H.; Klebovich, I.; Drabant, S.; Urtti, A.; Nevalainen, T. Different absorption profiles of deramciclane in man and in dog. *J. Pharm. Pharmacol.* 1998, 50 (10), 1087–1093.
28. Moughan, P. J.; Birtles, M. J.; Cranwell, P. D.; Smith, W. C.; Pedraza, M. The Piglet as a Model Animal for Studying Aspects of Digestion and Absorption in Milk-Fed Humans. In *Nutritional Triggers for Health and in Disease*; Simopoulos, A. P., Ed.; Karger: Basel, 1992; 40–113.
29. Daher, G. C.; Lawson, K. D.; Tallmadge, D. H.; Vanderploeg, P.; Miller, K. W. Disposition of ingested olestra in weanling mini-pigs. *Food Chem. Toxicol.* 1996, 34 (8), 693–699.
30. Bjorkman, O.; Crump, M.; Phillips, R. W. Intestinal metabolism of orally administered glucose and fructose in Yucatan miniature swine. *J. Nutr.* 1984, 114 (8), 1413–1420.
31. Forsum, E.; Goranzon, H.; Rundgren, M.; Thilen, M.; Hambræus, L. Protein evaluation of mixed diets. Comparative study in man and in the pig and rat of vegetable animal and vegetable protein diets. *Ann. Nutr. Metab.* 1981, 25 (3), 137–150.
32. Graham, H.; Aman, P. The pig as a model in dietary fibre digestion studies. *Scand. J. Gastroenterol., Suppl.* 1987, 129, 55–61.
33. Kurihara-Bergstorm, T.; Woodworth, M.; Feisullin, S.; Beall, P. Characterization of the Yucatan miniature pig skin and small intestine for pharmaceutical applications. *Lab. Anim. Sci.* 1986, 36 (4), 396–399.
34. Miller, E. R.; Ullrey, D. E. The pig as a model for human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 1987, 7, 361–382.
35. Shiu, G. K.; Sager, A. O.; Velagapudi, R. B.; Prasad, V. K.; Skelly, J. P. The effect of food on the absorption of controlled-release theophylline in mini-swine. *Pharm. Res.* 1988, 5 (1), 48–52.
36. Koritz, G. D.; Bourne, D. W.; Hunt, J. P.; Prasad, V. I.; Beville, R. F.; Gautam, S. R. Pharmacokinetics of theophylline in swine, A potential model for human drug bioavailability studies. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1981, 4 (3), 233–239.
37. Karim, A. Importance of Food Effect Studies Early in Drug Development. In *Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies*; Midha, K. K., Nagai, T., Eds.; Business Center for Academic Societies Japan: Tokyo, 1996; 221–229.
38. Li, Z.; Vachharajani, N. N.; Krishna, R. On the assessment of effects of food on the pharmacokinetics of drugs in early development. *Biopharm. Drug Dispos.* 2002, 23 (4), 165–171.
39. Wiegand, U. W.; Jensen, B. K. Pharmacokinetics of Acitretin in Humans. In *Retinoids: 10 Years On*; Saurat, J. H., Ed.; Karger: Basel, 1991; 192–203.
40. Pan, H. Y.; DeVault, A. R.; Brescia, D.; Willard, D. A.; McGovern, M. E.; Whigan, D. B.; Ivashkiv, E. Effect of food on pravastatin pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 1993, 31 (6), 291–294.
41. Pravachol tablets. Physician's Desk Reference. Thomson Micromedex. <http://pdrel.thomsonhc.com/pdrel/librarian/>.
42. Colburn, W. A.; Gibson, D. M.; Rodriguez, L. C.; Bugge, C. J.; Blumenthal, H. P. Effect of meals on the kinetics of etretinate. *J. Clin. Pharmacol.* 1985, 25 (8), 583–589.
43. Walmsley, B. H.; Fleming, J. S.; Ackery, D. M.; Karan, S. J. Non-invasive assessment of absolute values of hepatic haemodynamics using radiocolloid scintigraphy. *Nucl. Med. Commun.* 1987, 8 (8), 613–621.
44. Moneta, G. L.; Taylor, D. C.; Helton, W. S.; Mulholland, M. W.; Strandness, D. E. Duplex ultrasound measurement of postprandial intestinal blood flow: Effect of meal composition. *Gastroenterology* 1988, 95 (5), 1294–1301.
45. Foster, B. C.; Foster, M. S.; Vandenhoeck, S.; Krantis, A.; Budzinski, J. W.; Arnason, J. T.; Gallicano, K. D.; Choudri, S. An in vitro evaluation of human cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein inhibition by garlic. *J. Pharm. Pharmacol. Sci.* 2001, 4 (2), 176–184.
46. Di Marco, M. P.; Edwards, D. J.; Wainer, I. W.; Ducharme, M. P. The effect of grapefruit juice and seville orange juice on the pharmacokinetics of dextromethorphan: The role of gut CYP3A and P-glycoprotein. *Life Sci.* 2002, 71 (10), 1149–1160.
47. Dresser, G. K.; Bailey, D. G.; Leake, B. F.; Schwarz, U. I.; Dawson, P. A.; Freeman, D. J.; Kim, R. B. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2002, 71 (1), 11–20.
48. Takanaga, H.; Ohnishi, A.; Yamada, S.; Matsuo, H.; Morimoto, S.; Shoyama, Y.; Ohtani, H.; Sawada, Y. Polymethoxylated flavones in orange juice are inhibitors of P-glycoprotein but not cytochrome P450 3A4. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000, 293 (1), 230–236.
49. Jodoin, J.; Demeule, M.; Beliveau, R. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea



- polyphenols. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1542 (1–3), 149–159.
50. Piver, B.; Berthou, F.; Dreano, Y.; Lucas, D. Inhibition of CYP3A, CYP1A and CYP2E1 activities by resveratrol and other non volatile red wine components. *Toxicol. Lett.* 2001, 125 (1–3), 83–91.
 51. Neuman, M. Metabolic effects and drug interactions provoked by certain vegetables; Grapefruit, St. John's wort and garlic. *Presse Med.* 2002, 31 (30), 1416–1422.
 52. Vang, O.; Frandsen, H.; Hansen, K. T.; Sorensen, J. N.; Sorensen, H.; Andersen, O. Biochemical effects of dietary intakes of different broccoli samples; I. Differential modulation of cytochrome P 450 activities in rat liver, kidney, and colon. *Metabolism* 2001, 50 (10), 1123–1129.
 53. Wilkinson, G. R. The effects of diet, aging and diseases—states on presystemic elimination and oral drug bioavailability in humans. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997, 27 (2–3), 129–159.
 54. Bekersky, I.; Dressler, D.; Mekki, O. Effect of time of meal consumption on bioavailability of a single oral 5 mg tacrolimus dose. *J. Clin. Pharmacol.* 2001, 41 (3), 289–297.
 55. Marathe, P. H.; Greene, D. S.; Lee, J. S.; Barbhaiya, R. H. Assessment of effect of food, gender, and intra-subject variability in the pharmacokinetics of avitriptan. *Biopharm. Drug Dispos.* 1998, 19 (3), 153–157.
 56. Marathe, P. H.; Greene, D. S.; Kollia, G. D.; Barbhaiya, R. H. Evaluation of the effect of food on the pharmacokinetics of avitriptan. *Biopharm. Drug Dispos.* 1998, 19 (6), 381–394.
 57. Marathe, P. H.; Sandefer, E. P.; Kollia, G. E.; Greene, D. S.; Barbhaiya, R. H.; Lipper, R. A.; Page, R. C.; Doll, W. J.; Ryo, U. Y.; Digenis, G. A. In vivo evaluation of the absorption and gastrointestinal transit of avitriptan in fed and fasted subjects using gamma scintigraphy. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 1998, 26 (1), 1–20.
 58. Laitinen, K.; Patronen, A.; Harju, P.; Lovtyniemi, E.; Pylkkanen, L.; Kleimola, T.; Perttunen, K. Timing of food intake has a marked effect on the bioavailability of clodronate. *Bone* 2000, 27 (2), 293–296.
 59. Martinez, M. N.; Amidon, G. L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption; A review of fundamentals. *J. Clin. Pharmacol.* 2002, 42 (6), 620–643.
 60. Adkin, D. A.; Davis, S. S.; Sparrow, R. A.; Huckle, P. D.; Phillips, A. J.; Wilding, I. R. The effect of different concentrations of mannitol in solution on small intestinal transit; Implications for drug absorption. *Pharm. Res.* 1995, 12 (3), 393–396.
 61. Adkin, D. A.; Davis, S. S.; Sparrow, R. A.; Huckle, P. D.; Phillips, A. J.; Wilding, I. R. The effects of pharmaceutical excipients on small intestinal transit. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1995, 39 (4), 381–387.
 62. Basit, A. W.; Newton, J. M.; Short, M. D.; Waddington, W. A.; Ell, P. J.; Lacey, L. F. The effect of polyethylene glycol 400 on gastrointestinal transit; Implications for the formulation of poorly-water soluble drugs. *Pharm. Res.* 2001, 18 (8), 1146–1150.
 63. Hugger, E. D.; Novak, B. L.; Burton, P. S.; Audus, K. L.; Borchardt, R. T. A comparison of commonly used polyethoxylated pharmaceutical excipients on their ability to inhibit P-glycoprotein activity in vitro. *J. Pharm. Sci.* 2002, 91 (9), 1991–2002.

(葛庆华 译)



药典标准：美国药典和国家处方集^①

Lee T. Grady

United States Pharmacopoeia, Rockville, Maryland, U. S. A

引言

《美国药典》(USP)和《国家处方集(NF)》标准和规定涉及药品的质量、纯度、浓度、包装和标签及相关的事项。此标准是公开的,并且新的和修订的标准也将定期公开。根据此标准建立了药品通用名称和定义,以及检测的方法。但是,是否该药典反映了制剂技术的状况呢?

1995年美国药典大会通过的决议表达了代表团的关注和专家的意见。此次大会选举出由各专业专家组成的新的委员会。由138名与药典标准相关的成员组成了20个标准建立的二级委员会和一个联合标准/信息命名委员会一起对药典进行不断的修订。

USP24-NF19中包含有3777个专论和164个章节^[1],其中有543个新的专论,USP中有504个,NF中有39个。连续的修订产生了许多新的更好的需求。通过5年一届的药典论坛(PF),有3941个独立的修订项被通过。在本版本的准备过程中删除了一些过时的章节,包括130个USP专论,12个NF专论和4个章节。

1. USP 及其法律认可

不同于其他药典,USP和NF不是由政府制定的,而是由美国药典委员会出版发行,该委员会是非官方的、非盈利性的并取得公众信任的机构。USP和NF的标准是得到法律认可的,通过联邦政府和国家权力机构执行。医药行业的许多法规条款都参考USP和NF。最重要的是在联邦食品、药品、化妆品法案中的纲要中对其认可。这些法规通常被授权给政府机构以执行这些纲要中的内容。USP和NF标准中一般得到认可的是品名、浓度、质量、纯度和包装、标签的规定。1906年由国会颁布的纯食品药品法案在美国历史上具有里程碑的意义。正是在那时,USP-NF标准被赋予了法律地位,被联邦政府授权,就像现在的FDA,执行USP的规定。

1938年国会重申了其权威性,即使1962年的大规模修订也没有改变这一重要的事实。1995~2000年中,两部法令,1994年的膳食补充剂健康和教育法案(DSHEA)以及1997年的食品和药品管理现代化法案(FDAMA)通过联

邦食品、药品、化妆品法的修正扩大了USP和NF的适用范围。DSHEA特别提到食品添加剂应符合官方标准,如未达到则认为是标签虚假。FDAMA要求药剂师使用原料药配药时,原料药必须符合USP或者NF各论中的标准和药物配制通则。因此,USP和NF的出版并非顺应任何法令,但法令对其的认可使其在清晰和精确描述方面增加了责任。

除了各国药品法律的认可和注册、相关权威部门使用之外,药典的规定在商业准则上也得到了应用,商业准则要求标准化的物品必须符合药典的标准。

历史上,药典的产生比政府的法规早,因为在政府监管和执行之前必须制定规则。近十年来,除非药品及时进行了注册和质量详细检验,否则政府将不允许其上市销售。新药批准将获得很大的增值,但是国际化的商业行为仍要将这些要求作为基础。简明扼要的标准对政府管理工作起重要的作用,这些标准通常是一些文件的形式。

2. 任务

USP的任务就是通过由医药专家、患者和消费者建立和颁布法律认可的质量标准和药物使用的信息及相关条款来提升公众健康。

3. 美国药典大会

美国药典大会(USPC)由将近400个组织机构的代表团组成,包括医药院校、专业协会和一些联邦机构。该会议起源于1817年由Lyman Spalding博士发起的一个国家会议,当时是为了建立多种语言的国家药品标准以在发展中国家推广。美国药典于1820年首次出版(图1),现在的修订本是USP24、NF19^[1]。从1888~1975年,NF由美国制药协会单独出版。1975年,NF和由美国药典、美国制药协会、美国医学协会共同组建的药品标准实验室的资产一起归入美国药典大会。

药典大会的历史和组成的本质是其简明扼要的标准。美国药典的标准是从医师-药剂师-患者的角度来描述可接受的物品及使用时间(即有效期)的要求。此种角度带来的另外的结果是在指定的要求和限定内,实用性的,医药方面的重要内容占显著地位。药典标准总是以医学或药学专家的观点来制定的,在美国由美国药典大会提出。

^① 本书中,缩写USP单独使用时表示美国药典委员会或美国药典;后面紧跟罗马数字或阿拉伯数字表示药典某一特定版本。缩写USP-NF表示美国药典-国家处方集(U. S. Pharmacopoeia-National Formulary),除另有规定外,分别指USP24和NF19。

第一版美国药典，1820 年

前言声明

药典的目标是要在具有疗效的物质中选出那些使用方法得到最完善制定和最好理解的物质，并用这些物质组成制剂和混合物以获得最大的效果。应通过便捷而确定的名称来识别那些物品，这样可防止在医师和药师之间交流时出现困难和不确定性。

药典的价值取决于它对今天医学知识最好的真实体现；它的有用性取决于医学团体和公众的认可；以及它的推广取决于语言和企望应用它的人们的实践。

图 1 美国药典前言声明，1820 年

4. 修订委员会

5 年一届的美国药典大会在 1995 年选举出了一个修订委员会，该委员会由 138 名质量标准和药物信息相关的多学科的杰出科学家和业内人士组成。在标准和药物信息两方面工作启动时，预期有约 1000 名专家参与。这些专家来自工业界、学术界和政府部门。其中 100 名是公共标准方面的专家，另外 38 名接受安排从事药物信息工作。每个选举出来的标准制定专家被安排到 20 个分委员会中的一个或几个之中（表 1）。这 20 个分委员会主席和修订委员会主席组成了标准建立执行委员会。整个委员会采用“制度和程序”^[2,3]，通过其进行修订。药典分成许多部分委托给每个分委员会，然后经过其主席，分给每个分委员会成员。3700 多篇专论和 160 多篇一般检测和相关章节的编写都得到了分配。在每个修订周期中，USP 和 NF 的每个句子和每个标准及其认可都要重新检查。每个增加或更改的内容都要提前公布并征求大家的意见。

表 1 1995~2000 年 USP 小组委员会及其主席

小组委员会	主席
抗生素	Henry S. I. Tan 博士
生物聚合物、生物产品，疫苗	Everett Flanigan 博士
生物技术、基因治疗	Robert L. Garnick 博士
化学 1	Stanley L. Hem 博士
化学 2	Dennis K. J. Gorecki 博士
化学 3	Judy P. Boehlert 博士
化学 4	Elliott T. Weisman
化学 5	Edward G. Lovering 博士
溶出度和生物利用度	Thomas S. Foster 博士
赋形剂 1（专论）	Zak T. Chowhan 博士
赋形剂 2（方法）	Gregory E. Amidon 博士
通则	Thomas P. Layloff 博士
微生物学	Joseph E. Knapp 博士
多源产品问题	James T. Stewart 博士

续表

小组委员会	主席
天然产品	Paul Kucera 博士
非处方药和营养补充剂	David B. Roll 博士
包装、储存、分配	Thomas Medwick 博士
放射性药品	Dennis P. Swanson 博士
毒性、生物适应性、细胞培养	Sharon J. Northup 博士
水、注射用药物	James C. Boylan 博士

表 1 中的分委员会的名称列表显示目前委员会关心和涉及的内容。每个分委员会各负责着一个方面的事务，这样的事实说明了它涉及内容的重要性，也暗示了它在委员会的讨论议程中在此领域具有优先权。如果这些涉及的内容有变化，将在美国药典期刊、药典论坛上公布并讨论。就像在“规则和程序”中以及上述内容提到的那样，分委员会的任何举措，或者对于标准的任何修订或者采纳，都要向公众公开以征求评价和评论，并受到申请延期机制的制约。

5. 专家委员会

2000 年的美国药典大会采取了制定公共标准的新构架和新程序。专家委员会代替了以前的修订委员会。本书没有介绍专家团队的产生和职责情况，但可以在 2000 年的药典论坛上找到。

6. 总部

美国药典大会的总部拥有几栋大楼及 Rockville 的实验室。总部招聘了大约 300 名科学家、编辑以及其他雇员以支持修订委员会（专家理事会）的工作。1998 年 11 月位于参考标准实验室和参考标准业务科的参考标准中心开放。美国药典研究和实验发展实验室仍在 1989 年的总部大楼内。作为出版商，美国药典大会自己完成照相排版，全部的室内编辑和印刷，所以能够及时出版该标准，并且可以利用快速发展的信息技术产品来跟上时代的发展。

7. 资金

标准设立是独立的，因为在能够提供足够资金的管理部门的标准的影响下，对此项目的支持是公正的，资金不来源于与那些标准相冲突的对象。来自政府和制药企业的直接和有限的资金支持将使标准的设立缺乏自由度和令人失望。优先权的倒置和负面的影响与直接的资金支持是分不开的。资金的独立是 USP 正常运转的一个组成部分。政府或者制药企业都没有对美国药典大会制定标准的任何活动直接提供资金。由于这两者是许多非盈利机构的主要经济来源，因此导致美国药典大会缺少足够的资金储备，必须谨慎支出。但由于公众的信任和日益增长的支持以及这些这里提到的辅助计划，美国药典大会会有足够的收入面对

Y

这些挑战。美国药典大会的收入主要来源于以下几个方面：参考标准和出版物的出售。委员会成员、顾问组、理事以及大会代表都没有经济补偿，他们的工作都是出自于他们的公众服务意识和职业责任。

项目和出版

1. 药典论坛和连续修订

药典论坛每年出版两次官方的增补本，这也是 USP 能做到连续修订的主要特征。只有以这种方式 USP 才能跟上药物技术发展的步伐，不致于落伍。至于制药工艺，无论是设计、生产还是试验，都在不断地发展，药典的标准应跟上这一趋势。2000 年，出现了电子版和网络版的药典。

双月刊的药典论坛，名为“药物标准建立和官方标准修订杂志”，刊登提议出的新的或修订的 USP 和 NF 标准以征求公众的意见。药典论坛使评论者能够迅速浏览经提议待删除的内容和增加或更改的内容。所有感兴趣的团体都可以订阅药典论坛。这样，来自于公众而不是修订委员会和顾问组的感兴趣的科学家和业内人士能够接触到官方标准和试验中最新提议的修订内容，很容易传递他们的评论、建议和数据给 USP 总部以便修订委员会参考。

除了在标题为“修订中”的章节列出由修订委员会提出的建议外，药典论坛还包括许多其他章节。“总部专栏”列出了的信息有：出版期限、新闻、药典大会和修订委员会的声明、药物标准修订执行委员会讨论议题的总结，以及多种为多重修订计划制定的表格或者目录。在一个名为“修订推进程序”的章节，刊登了权威委员会的报告和声明，与标准有关的科研论文、有关团体的一般性评论以及为符合政策而对评论的校勘。最近增加了国际协调方面的章节。

药典论坛的目的是在标准制订得尽可能早的时期推进公众的评论。在此项工作中，制药企业是最大的独立参与者。该期刊能够促进公众的评论，因此随着修订的发展它也是可以信任的。USP 的修订类似于触变胶体，即压力增加后，它就会流出。该期刊与公开会议计划先后发行以确保持其能积极参与到标准的制定之中。

2. 相关出版物

这样的努力使得 USP-NF 在世界范围内得到更广泛的使用。包括多种维生素产品、生物技术产品、兽药、植物药和其膳食补充剂等联合制定。USAN 和 USP 的药名词典在世界范围内广泛应用，使其成为包括美国和英国均采纳的国际名称与命名法的知识库。药典论坛目前包含了来自于日本药典和欧洲药典的建议的公告，有助于标准修订国际统一和协调。

3. 公开的会议

根据 USP 的标准的设立中公众参与的政策，公开会议

举行时允许对所选的议题进行相互检查。在 1980~1999 年之间，举行了 25 次这样的会议，每次大约 150 人参与。采用圆桌会议的形式保证获得最大的参与率，标准的修订也采用同样的形式。

4. 国际培训和超越计划

USP 的标准和资料在许多国家得到认可和使用^[19,21]。USP 也在寻求鼓励、提高和便利使用的方法。例如，USP 计划培训非美国籍的科学家，并征求如何使 USP 的计划和产品在其他国家更加有用的建议，包括赞助访问科学家和访问学者，资助博士和博士后奖学金，协办会议，组建国际卫生顾问团。

5. 访问科学家和访问学者计划

1990 年以来，USP 已经充分的拓宽了访问科学家和访问学者计划。该计划最初的构想是培训来自于药典和官方质控实验室的科学家，现在该计划已经扩展到培训在 USP 药物研究和检测实验室或者 USP-NF 标准制订分会秘书处工作达到 4 个月的科学家，使他们获得实验室技术和药典修订程序方面的经验。来自于管理机构和世界范围内的药物信息中心的学者也包括在该计划之内，这些学者主要关注编辑和更新 USP DI 数据库和 USP 的信息产品的工作。

1990 年以来，USP 已经接待了来自中国^[13]、印度尼西亚^[2]、阿根廷^[5]、尼日利亚^[3]、波兰^[2]、罗马尼亚^[2]、土耳其^[2]、俄罗斯^[2]访问科学家和访问学者，以及来自德国、日本、泰国、韩国、肯尼亚、意大利、塔吉克斯坦各一名人员。

6. 奖学金计划

奖学金计划最初主要是针对于攻读博士和博士后的美国学生。1981 年以来，USP 已经授予了 160 名奖学金获得者相应的奖学金。USP 的奖学金计划也授予在美国的大学和美国以外大学中的非美国籍的学生和博士后，条件是必须满足授予标准。目前 USP 每年授予 10 名奖学金获得者：6 名在药物标准领域，4 名在药物信息领域。金额是每年 \$15 000，获得者可以竞争第二年的资助。符合需要的标准以及其他因素，奖学金由以下人员签署：USP 修订委员会的一个成员，顾问团成员，或者审查申请机构的理事会成员。标准信息分会修订委员会委员从对 USP 标准和信息计划的技术价值和适合方面来审查申请。

7. 亚洲版本

为响应全球化和 USP-NF 日益增长的在其他国家的使用和交流，USP23-NF18 和 USP24-NF19 在美国和印度孟买同时出版。

8. 西班牙语版 USP-NF

西班牙语 USP-NF 于 1995 年以 DOS 形式的电子版出版。1998 年，该产品转换为 Windows 形式。USP-NF 在



1993 年开始开发适合 USP-NF 翻译特征的机器翻译软件。该软件为泛美卫生组织的 ENG-SPAN-AMSM。它是一种专用于药典的加强型的微型字典和软件。从 1995 年开始发行以来，美国药典已经发行了西班牙语版增补本，并与英语版增补本同时出版。数据库一直随着 USP 和 NF 的修订而更新，但 1998 年之后就不再销售。

药典标准的性质

1. 范围

美国药典的开篇是这样写的：“药典的目标是要从具有药物效用的物质中选出那些标准制定最完善和最好理解的物质”（图 1）。随后召开的美国药典会议将此范围扩展为包括所有的安全和有效的药物以及相关的一些物品。被 USP 收录不是根据制造厂商的身份，药物使用环境以及商业上限制的存在。物品被收录入 USP 后，无论其是非处方药或处方药，在家里使用还是在从开业者的设施内使用，或是在医院里使用，或者甚至在有许可证的设施内使用，都将建立科学合适的标准。应用同样的现代化标准，公众将得到同样的浓度、质量、纯度等参数。同时，对于分析或者管理也存在着相同的机会。

2. USP 和 NF 标准是公开的

C. A. Johnson 对该特性在后来的英国药典中给予了清楚的表述^[4]：

重点强调的第一点是药典收集了公开的可用的标准，其标准可以接受所有人的检查和质疑——这是文明社会的一个基本权利。该标准在广泛而公开的咨询后建立起来。

——这一程序应得到持续和支持。因为药品标准是公众使用的，任何权力部门或者个人都可以随意抽取市场上的药品进行检测。

如前所述，由专家建立起来的药典标准维护了公众利益。USP 的管理制度中并没有规定每天应用药物检测技术管理药品。不能将美国药典标准与“产品说明书”等这样的概念相混淆。如下所述，药典标准不是制造指南，同样也不是制造商的标准，药典定义了使用可以接受的物品。

3. 药典标准的功能和职责^[5]

美国药典标准的功能是什么呢？首先，记录标准的属性。标准是一种规则，一种有规律的法则，它意味着：①许多相关联的默许或者同意；②某种权威性；③所有相关者的既得利益。为了以合理的民主方式获得同意，但又存在当权者反对的法令，因此应有一个折中的方案。然而，有一个事实不容忽视：一种规则的采用就意味着另一种规则的摒弃。从某种意义上讲，就丧失了选择的自由。这样问题出现了——我们能得到什么？为什么要标准化？为什么有时要进行痛苦的折中经历？我们获得规律而不是混乱，但是这种规律在哪里，只有这样，我们才能具有预见能力。

美国药典标准的本质是可预见的药品的质量。这种预见性的利益给予了所有相关的人：公众、专家和产品制造商。应用中没有预见性，药品就不会获得其在当今社会的一席之地。采用物理和化学的方法和规范来检测质量参数。采用普通的词汇和清晰的表述建立药品的通用名和定义，以利于专家之间交流。

为什么我们坚持说是“公众的”标准呢？因为药典标准，无论是提议的还是采纳的，都以公开的方式出版和流通。标准面向公众、厂商和专家，从一批到另一批或从一个厂家到另一个厂家的建立其可预见的药品标准。可预见的参数出版后让大家看到、讨论、同意、或者公开辩论。其他的协定和其他的折中方案，不管其是如何有理、有序，或者出于何种原因而不能，都不能满足简单、公正的公众需求。

将可预见的要素编成法典并不是向公众开标准唯一的功能。USP-NF 标准是法律可实施而且是强制实施的，美国药典标准的第二个功能是：为防止公众接触到未收录物质提供积极的保护，而不仅仅是建立想法而在方便时忽略。USP 和 NF 给出了依从于标准并可以得出结论的详细检测方法和步骤。实际上，不能提供证明性试验的质量水平是不能强制执行的。美国药典的第三个功能是：制药厂商知道有同产品的其他厂商也一定合格。两个不明显的意图应该受到注意。修订过程的参与者在重要问题或者新技术上将重点放在了制药企业和政府方面。同时，在很大程度上药典标准决定了药学分析技术的现状，因此会影响一般药物的注册和国内外的非官方物品。

除了规定的可接受物品，USP 和 NF 标准的职责是什么呢？USP 必须独立而有效地在所相关的团体权利与患者对药品安全的需求之间建立一种平衡。USP 和 NF 应首先对公众负责，能够鼓励专家制定公众不能做出的质量判断。USP 和 NF 也应对那些医药从业者负责理解并遵守标准要求的。USP 和 NF 负责标准的发布和管理。对于制药企业，USP 和 NF 负责制定出有意义的、可行的、可操作的标准。USP 和 NF 的目标是制定对需要者是平等的标准，被强制执行，并满足于有能力的制药厂商，至少在当今满足药学家和从开业者的需求。

在美国，药品质量作为一个整体比医疗系统的其他方面更可靠和有预见性。增加的试验或者制造商制定规格，除了增加纳税人在药物上的开支之外，并不能帮助患者和专家从药品上得到更多的利益。有些药品应该说明让其他人知道什么时候停止服用。我们必须能够意识到减少重复使用。

药品质量应突出明显的细节问题，对技术性的团体以最清楚的方式显示。我们所关心的是领域内的专家。相反，考虑到我们要经过努力才能看到可预见的治疗的难题——不是在批次间或品牌间的可预见性的结果之间的差异，而是遗传药理学上的差异；饮食习惯，例如，偏爱饮料或者主菜；疾病状况、不同年龄、不同性别的代谢；或者更大规模的患者依从性或者药物的相互作用的失败。

4. 标准的一般方案^[5]

我们能够认可三种不同但又相互依赖的有效标准：①USP-NF 标准；②现行的生产管理规范；③室内质量保证或过程验证方案。这三种方案不相同但有相同的目标：药品质量。在这种多重的标准下，官方标准发展将有很大的意义。近几年，同样的标准出现在很多发达国家，这是成功的测量标准。

目前，公开的标准趋向于执行标准而不是设计标准。例如，是否仅通过测量汽车的排放物来判断是否成功减少了污染物，或者以画有发动机图的“官方的发动机”来判断？在性能试验中，对于生产后的产品需要测试期望的属性。这就是终端产品测试。所有这些都回答了以下这个基本问题：它是如何运转的？收载时间较长、具有类似处方的公式但试验很少的各论，本质上就是设计标准。只有一些这样的各论在 USP24 里存在。现在药学处方将产生更具设计型的标准。性能试验的趋势现在已存在于所有标准中，除了铅编码外，因为我们可以想象到这种困难把管道检查员的视察从管道允许的接口、角度和材料的检查转变成，牛肉泥测试样品的回收率是通过还是不通过的试验。当终端产品测试能在设计测试和不用设计测试过程都有充分自信时，药物技术将重新制定设计标准作为一个“验证过程”。

设计的标准本身必须是更详细、更综合、更决断的。USP-NF 可以定义特殊的处方，如果有必要，可以定义化合物的合成方法和制造过程。然而，多数药物科学家相信终端产品的测试满足公众的标准，这就是患者的治疗——终端产品测试。

USP-NF 标准的建立具有作为强制执行的特定目的。因为这些标准在法律许可的范围内具有普遍的意义。药典既规定了实验的详细内容，也规定了结果必须符合的限度。通过或者未过——不是多好，或者多少，而是它是否为可接受或不可接受的物质？USP 要求超过 USP 规定以外的产品视为不符合药典的标准。药典标准就是在有效期内任何样品在任何时间必须满足的标准。虽然不是作为一种颁布的标准来使用，但是在设定失效期上很明显它是最根本的因素。它是在漫长走廊终点上的一扇门，而不是立即对市场开放的门。

5. 标准的局限性

让我们从真实性开始。产品中建立的质量，但不能够检测该产品。事实上建立了不能检测产品的产品质量，就像来自于优良规范的一个变种。最近的一个世纪一直是有争论的问题是：重新定义什么是好的更有意义的标准，什么是足够好的标准^[6]。在这种形势下，发展了统计学的质量控制。我们接受了这样的观点，甚至生产中的绝对精确成为可能（这是不可能做到的），当然这是不必要的。当我们为产品的一致性而努力奋斗时，我们仍然要记住质量是不同的，以便我们真正达到在一定限度之内的质量标准化。

这就是为什么“质量”需要控制。控制的目标是在一定的经济条件下，做我们想做的^[6]。

我们接受了非完整性的必然性，这样我们必须接受质量标准的必然需要，也必须接受同样质量标准的非完整性。药典标准必须是能做到的；不能出版的标准往往因为其不能完全服务于公众。我认为：一个积极主动面对非完整性的举措就像笛卡尔的座右铭^[7]，其适用于任何不确定的情况，并以最有希望的方向坚定不移的前进。

药典标准的技术特征

药典对当今技术的表述与对目前治疗的表述一样多。在任何时间和地点对老版本的药典的检查都应该给当时收录的药物、治疗方法和药物知识给予公正的评价。这种检查不亚于对当时的药物技术的检查。药物标准来源于同一时期，控制包括好的质量体系以及如何完成和操作这种质量标准。然而，在通常的使用过程中，对要求的选择只能从过程和设备上获得。可以使用的技术决定了什么是需要的或标准的，就像它决定了什么能够被制造。

药典和药物技术之间存在着很大的相关性。至少在现在的药物时代是这样。新药的发现是以这样的速度：一代新药的产生使得药典过时，特别是那些修订比 USP 慢的药典。国际贸易的增长和认可，减少了对不少国家的药典的需要。技术稳步发展并领先于生产、设备、剂型设计、新型辅料和新的分析能力的发展。一些药典只有持续出版与药物技术发展状况相一致的可实现的规定。这些药典主要在一定的区域之内或者是国际性的范围内使用。对于迅速变化的治疗法和技术的不同改编本说明了药典内和药典之间存在着不协调，而结果是需要进行协调。在这里我们论述了目前的药典，是什么，是谁和在哪里建立的，以及如何和为什么要建立。

1. 官方名称

药典集中反映了存在数年，甚至几世纪的在医疗、药学或者药物技术方面的问题。从药典建立之初，名称这个基本的功能就建立起来，“这样可防止在医师和药师之间交流时出现困难和不确定性”（图 1）。不同的事物应有不同的名称，这是药典标准的一个基本原则。这一基本原则也包括剂型和分子式。直到有人想要改变这些事物时这种本身的功能才得到关注。最近的一个例子就是希望通过产品标签中的非活性成分来改变消费者鉴别产品成分的能力。这些需要简明、明确的命名这些成分以及必要的标注。

1961 年美国医学协会和 USPC 开始合作，在 1964 年，这种合作扩大并增加了美国药物协会，然后 NF 的出版商也加入了合作，由此形成现在的美国命名（USAN）委员会。1967 年美国食品药品监督管理局（FDA）被邀请加入该委员会，然后 FDA 在其规定中使用 USAN 的命名。该委员会由熟悉命名药物需求和问题的人员、仲裁员组成。由该委员会确定的名称与药物的其他名称（包括公开名、专利名、化学

名和代码名)一起编撰成年刊书籍。书名为《USAN 和 USP 药名词典》，由 USPC 出版。

2. 方法和说明的选择

选择 USP 的方法和说明可以得出一些可实际应用的结果,即什么是检测药品质量差异成功,什么是在可接受的药品质量限度内的差异。之所以选择 USP 方法是因为它适用于各专论使用,就像和 USP 的参考标准因其适用于各专论而被采用一样。

试验和规格、试剂,在 1890 年引入 USP。最初真正意义的仪器测定是在 1890 年采用旋光计对天然油进行测定。USP X V (1995 年)倾向于减少专论的规定或者设计标准,增加一般检测的范围。USP 现在有 160 多篇通则。在现代药物分析上使用的分析方法很少不是药典上记载的方法。

USP 发展当中的有趣的历史性的变更暗含在此论述中。直到使用仪器的年代,人们希望药典标准里的方法能够在公共药房里使用。是否能实现决定了在何处可以做到,然后又把焦点从药房转移到了分析实验室。

最近十几年,药典方法的选择发生了很大的变化。经典的物理和化学检测作为客观的标准已经建立,用于质量保证和检测,但这些方法对于制剂有很大的局限性,包括含量测定和限度检测。近几十年仪器发展迅速,仪器方法在工业上的应用已经相当普遍。以前的局限性因素,仪器的实用性和可靠性(或者维修的确定),即使在微电子学革命之前也已不再是一个问题。

在过去的 20 年里 USP 在修订各论时把重点放在了稳定性和杂质上。参见 1086 页官方条款中的杂质^[1]。这些主要的趋势阐述了色谱法的重要性。很明显近来修订的部分主要围绕着色谱法:高效液相色谱法(HPLC),气液色谱法(GLC)、薄层色谱法(TLC)作为鉴别试验和参考标准的评价;HPLC, GLC 和 TLC 用于纯度或者限度检查;HPLC 和 GLC 用于含量测定。为了评价色谱系统和确定系统适用性试验(参见下面的讨论)以使这些方法更可靠,人们作出了不少努力。具有惊人分析速度的 HPLC 为一种成熟的科学测定方法在药物分析中被采用,目前在 USP 中比其他方法更灵敏。USP 24/NF 19 里含有 1800 篇的 HPLC/GLC 和 740 篇的 TLC 的初始参考。由于在剂型各论中物质检测方法的交互参考,以色谱为基础的方法总数要更多。

现代分离技术在很大程度上已经解决了以前药典标准方法选择中的明显问题,即干扰物质的问题。USP 并没有要求所有的厂商有相同的处方和生产工艺,USP 允许厂商有较大的自由,只要剂型中增加的物质不干扰测定,这些物质不能影响官方的鉴定和检测^[8]。因为厂商能改变处方或开发新的产品,所以 USP 不可能测试每一个设计好的和将要设计的产品。因此,在改变剂型的过程中,厂商有责任在药典论坛上提出建议,以对他们的现有产品和预期开发的产品检测方法的适用性进行评估,即验证他们的处方。

分离科学现在有可能对所有能够鉴定的物质都进行分析。

3. 自动化方法

在考虑引进新检测方法时,对 USP 来说认可合适的自动化的检测和含量测定是必要的。修订委员会更喜欢采用自动化的方法,特别是对于测定多单位量的样品,例如,溶出度试验或者含量均匀度试验要求的样品。因此,自从 1970 年 USP X VIII 出版之后,USP 的凡例包括了使用适当替代方法的自动化步骤。USP 24 的凡例声明^[9]:

应用于基础化学的自动化检测步骤作为含量测定和试验的方法合理的用于各论中作为决定的依据。这种依据也可通过使用替代方法来体现,替代方法应有较好的准确度、灵敏度、精密性、选择性的、自动化的适合性、计算机化数据处理或者其他方面的优势。由于药典标准和步骤是相互关联的,所以在测得结果有差异时或有争论时,只有在该药典中给出的步骤下获得的结果才是最后的结果。

因此,USP 明确表明要做什么和以怎样的顺序操作,而不是由谁来做或者由什么来做。

4. 稳定性

各论并不包括直接与药品质量相关的这一主要方面的特定章节,主要是因为稳定性与许多影响因素有关,包括化学结构、处方成分和工艺、生物负荷、包装材料和储存、重新包装和地理环境。在药典中至少在 7 个地方明确阐述了稳定性:①有效期的一般要求;②各论中对包装和储存条件的一般要求;③包装材料和容器的标准;④重新包装和储存的标准;⑤降解产品的限度检查;⑥稳定性测试及测定方法;⑦信息通则中“分配体系中的稳定性考查”。这些标准中最基本的是对储存条件的标准定义。对不稳定性制剂的需要而形成的一项规定将增加一个第八项与稳定性结果有关的分类。新的信息章节将拓展此内容。稳定性并非原因——它是在指导制剂研发、包装及储存的过程中选择的结果。

5. 试验结果、统计和标准^[10]

药典标准偶尔会与出厂试验和统计取样计划相混淆。对官方分析测定结果的解释要求理解药典标准的性质和类型。USP 中收录的分析测试规定了单一样品的操作,即单一测定的结果判定。这是按照药典标准中的项目属性能够测定的最小样本量。一些试验,例如,溶出度和剂量单位的均匀度试验,要求多剂量单位测定,并有一个结果方案。可以这样理解,虽然使用了许多剂量单位,但是实际上是该样品的那些特定特征的单一测定。这种定量不应与统计取样计划相混淆。药典标准步骤证明了一个物品属性具有药典标准的依从性,但只限于被分析的样品(单剂量或多剂量单位)。药典标准并没有规定和指出要对更大数量的结果进行重复、重现和推断;这取决于测定的目的。

商业上或管理上的依从性试验,或者厂商的出厂试验,根据预先制订的方针或者取样办法,可要求或不要求额外

样品的检查。而且,有必要制定一个统计计划使产品的使用时间、测试结果和出厂规定与最后的药典标准相关。

6. 系统的适用性试验

系统的适用性试验现在是 USP 方法的特征^[10,11]。这些试验是在 1971 年初本文作者提出的观点为基础的,该观点认为仪器、试剂、包装、条件、步骤细节、检测器、电子附件,甚至分析人员构成了一个单一体系,因此这个体系具有一个全面测试的系统功能。例如,可靠的色谱性能要求具有分离度、柱效、峰拖尾、精密度或者极端条件的规定。这样的试验避免了对多数仪器设置、型号、生产厂商、填料及批号,以及其他理化性质和工程特征规定的必要性。同样也避免了从药典总部官方批量购买色谱填料的必要性。色谱适用性试验首先是在 USP XI 里正式采用,现已普遍应用。

7. 新技术和 USP 的内容

在修订周期内,USP 引入了一个网址,其包含了关于 USP 及其计划和定购方面的新信息。USP 的主页是 www.usp.org。

法律和法规保证了药物制造和希望按照药典标准的制剂的前提、实践和文件。以前对 USP 的修订也更新了在资料通则里的 FDA 的生产管理规范 (good manufacturing practice, GMP) (1077)。这被认为对生产的建立和药剂师是有用的。旧习的废除使因特网快速发展,一般而言看来需要这种服务,几乎所有的国际网站都建立起来。因此这一修订周期随着联邦文件和其他文件的删除达到顶点,而现在这些文件可通过新技术无条件地较可靠地获得。联邦文件可以在美国食品药品监督管理局的网页 www.fda.gov 上找到。和生产管理规范一起 (1077),两个其他资料通则也根据联邦法规得到了消除:与人类使用药物有关的联邦食品药品和化妆品法案规定 (1076) 和经常修订的受控物质法案 (1071)。

8. 药物的释放

没有一个地方的药物技术的价值和失败 (和政治压力) 比活性成分从药剂中释放过程的复杂性更明显。大多数的观念,现今老一代人认为口服固体药剂由此释放药物^[11]。USP 和 NF 在 1970 年的六个各论中都介绍了溶出度试验。对于一些药物,溶出速率控制了吸收过程,因而减少了生物利用度。这是在浓度上的准确减少,并在医学意义上没有附加的结果。问题是当比较这样的一种药物的两种处方时,可发现溶出速率很不相同——即生物不等效性。这导致了商业上的是非,和歪曲了在竞争中药品保护的科学事实。一些科学家把药物化学的性质,例如,颗粒大小和溶解度作为重要的影响因素。其他科学家则指向其他因素包括在压片中的非活性成分——例如,润滑剂和崩解剂。或者把过程本身作为重点,就像是过压。实用主义者注意到对疏水片剂包衣的连续使用,如虫胶。

药物的释放试验、溶出度测定在每次需要解决任何实际问题的问题时是一个令人满意的标准。溶出试验作为一个质量控制的工具,其浓度的认可也具有同样的意义。因此,根据生物利用度和质量控制的考虑因素可以得到溶出的等效性。USP 24 对于片剂和胶囊具有 600 多篇的各论:500 篇要求做溶出试验,其他 100 多篇对可接受的药品质量具有不同的适当的性能试验。

对于 USP 的片剂和胶囊各论,我们知道两种完全一致的药物不会在临床意义上不等效。实验也证明了当在生物利用度上推测为相同的药物具有医学意义上的差异时,溶出试验可以有效的识别这些药物。因为 USP 阐明了一种药物的特征,所以这样的一种识别试验是较令人满意的,这是因为溶出标准能够决定性的排除任何不能接受的药物。因此,并不一定要求对动物和人类做生物利用度试验。在实际中也发现了一些问题,即溶出试验识别的是处方的影响因素,所以有时仅会影响到生物利用度,这对于典型的溶出试验结果较差而临床上可接受的药物却经常会碰到。在这种情况下,修订委员会已留意尽可能多的可接受的药物,但同时删除了许多溶出的规定以增加对生物不等效的合理科学考虑。

以任一官方的仪器,在通常的速度下,在水中 37°C 45min 的溶出试验中,溶出 75% 的药物在医学意义上没有生物不等效的问题。大多数的各论把这些条件作为要求,这在药典论坛上称之为“第一情况” (“first case”)。而其他药物,若有不清楚的或可能的医学意义上的生物等效性问题,则要对溶剂或仪器作出适当的改变。

在 USP 中能够发现试验和规定的具体细节。对于普通的片剂和胶囊,使用的仪器 (篮和桨) 能够进行低水平的搅动,可挑战药品的生理利用度减少的潜在可能性。类似地,应选择最具有识别力的溶剂。参见 1088 页,“剂型的体内体外评价”。缓释处方提出了不同标准的问题。药理声 (pharmacologically sound) 判断一种药物作为可接受的缓释药,消除了应用于普通药的仪器和条件的必要性的保守选择。要么药物没有显著的吸收问题,要么它的代谢物有活性,在这种情况下需要较高搅动的仪器。现在正在设计一种新的仪器以解决以目前的仪器没法解决的问题。

9. 膳食补充剂

膳食补充剂现在也在联邦法律的范畴之内。(参见上述官方标准的法律地位底下的 DSHEA)。它们是消费者的消费品种中快速发展的一个品种。在 1995 年的大会之后,USP 和 NF 在这方面的工作有了较大的进展 (1995~2000 年的会议决议)。该大会积极辩论了饮食补充剂在药典中的定位问题,还有是否要重新恢复植物、氨基酸和其他物质在美国的使用问题。而这些在本世纪初早已废弃不用了。这些标准的可行性已快速地建立,并要对于 USP-NF 的各论建立起广泛的支持。对于消费者和开业者,信息面曾有较多争议。首要的任务是识别那些没有妨碍安全问题的最广泛使用的植物。

各种膳食补充剂具有不同的法律依据，有以食物来管理的，也有不是以食物来管理的。与药物相比，补充剂并不要求符合药物的药典标准，除非标明是官方的药品，在这种情况下就要求应用药典方法来测定。USP 或 NF 增补本规定的标签只能一时地获得。虽然对于维生素、矿物质已有大量的分析方法，但在分析植物药时有可能出现问题，因为试验的惯例并不普遍。这主要由于成分极其复杂，对于关键的成分具有不确定性。

回应 USPC 1995 年五年一届会议之后所作的决议，修订委员会发表了一些文章，其与作为膳食补充剂使用的、以植物为来源的天然药物有关。天然产物小组委员会在顾问团的帮助下，在天然产物鉴定和特征分析方法方面，对 21 种植物药的标准发展制定了优先权。选择的标准包括了没有安全风险、通过贸易来源报道的使用范围；由生物学家认可的正面评估，其通常是假设具有有利的药理活性和传统药物使用的历史；以及药物符合某一 USP-NF 各论要求的能力。

现有一个新的政策专门负责作为膳食补充剂使用的植物药，该膳食补充剂由 USP 修订委员会建议正式采用。当 FDA 已经批准使用或者 USP DID 顾问团已经认可使用时，就列入 USP。如果两种情况都不满足，也没有安全问题，该药物就被列入 NF。如果有安全问题，那么不会出版 NF 各论，USP DID 将出版该药物使用负面方面的各论。第一篇来自于 1995 年 USPC 的官方各论出现在 1997 年 USP 的第七次增补本中，为 USP 中的生姜。在 USP24-NF19 的第一次增补本中总共出版了 18 篇各论。

10. 调配药物各论

由于药物效力的不可利用性或者特殊群体特别是小儿患者的剂型需要，或者是人们对短效制剂，例如，稀释的氯化钠缓冲溶液的需求，药物的调配重新发展起来。已经成立药学调配顾问团。该顾问团的药学专家负责对包装、储存和销售方面的小组委员会作出建议，这个小组委员会一般能解决在处方的稳定性、包装和储存方面的问题。

USP 的实验室对所有的各论进行了评价，评价结果发表在 PF 上。十个官方的各论通过 USP24-NF19 的第二增补本出版。国际复方药剂师协会在许多已知处方中选择并鉴定出那些更具有医学价值和更宽使用范围的处方。增加各论有望在以后的增补本中出版。如可得到商品化的物品，则不需要复方 USP 的各论。如上所述（参见官方标准的法律地位），最近的法规支持和指导药物的复方。

11. 辅料

USPC 大约出版了 350 多种辅料的标准，主要在 NF 中（约 270 种在 NF 中，80 种在 USP 中）。在 1975 年以前，USP 和 NF 分别由不同的部门出版，均具有药物、剂型和辅料方面的标准。USP 采用的是医学上最好的，而 NF 采用的是使用最广泛的。在 1975 年两个部门合并之后，决定出版 NF 中所谓的无活性成分，而且，USP 和 NF 将合并为

一本出版，增补本也是。

制药技术曾经推动了新的或精制的辅料的发展，而其中一些性质直到现在都没有被利用起来。聚合物就是一个例子，其在最近几年是辅料发展的热门。在新处方中使用到的材料对现有的标准提出了一个新的、不同的挑战。现代的分析化学能够对材料进行更加彻底的评价。

辅料是国际协调计划的一个主要的、初始的组成部分。USP 把精力集中于功能性试验，例如，可压缩性。这些对于许多辅料是可以获得的。为什么合并到 NF 的功能性要求，即评价对少数购买者是重要的参数，这样限制了商业通路和可能增加每人的费用？如果黏性的范围或者结晶程度对一个处方是重要的，那么难道这对该处方不是一个问题吗？可采纳一个标准的试验作为解决方案，但要求该产品的标签要声明符合规定的内含物品。产品的标签应指出确切的参数。现在的 NF 具有一系列的标准，有特性、纯度、含量测定、湿度、包装、储存和标签等以支持物质的命名和标签。

12. 参考标准

为了支持药物公开标准的计划，USPC 供应参考标准，其由 USP 和 NF 专论的标准、分析测定方法所要求。USP 的生物含量测定最先要求参考物质的使用。这些需要权威的来源，最初在 1926 年采纳。作为分析科学发展的指标，在 1950 年，对于 USP 和 NF 需要 45 种，在 1980 年为 438 种。到了 2000 年，有 1400 种。

人们不能不注意到在过去的几十年里所收集内容的巨大扩展。当然这不是通过额外的生物含量测定方法而发展。在初始发展阶段，是作为鉴定和含量测定的分光光度测定法的广泛利用。分离科学是制药工业控制实验室的第二阶段。作为必然的结果，USP 和 NF 方法的选择向同一方向发展。分光光度测定法鉴别试验和含量测定方法更可靠，特别是对于依从性试验，当以相对模式进行时，其使用了一个参考标准，而不是绝对模式，例如，滴定试验中的标准。在这一点上其他国家有一些微小的差异，争论的回答是制药工业分离科学和药典标准的广泛采纳。色谱方法的一个特征是使用了参考标准，有时对于一个步骤还使用多个参考标准。现代分析测定方法的积累导致了許多参考标准（5~10个）的使用。

这个计划的两个重要特征应该记住：所有的 USP 参考标准都要经过合作试验以产生一个纯度概况，然后必须经过 USP 参考标准委员会的核准。USP 参考标准委员会由标准制订执行委员会分支的成员组成。每一个有三个或者更多的实验室参与试验。为了这个目的，参考标准的纯度定义为与使用目的有关的已知组成。一批化学品的采纳要求一个已知的纯度概况，其可通过有价值的试验获得。虽然要符合 USP 或者 NF 各论的要求，但是试验通常是以超过各论的试验的进行以构建一个纯度的概况，特别是更广泛色谱特征的积累。与高纯度合成的有机药物相比，天然来源的不同物质除了高纯度的化学合成品之外被继续使用。





基于生物技术的产品一般都属于化学复杂物，这些物质在国际标准中通常具有对应的部分，但本质的不同性使得其不能进行直接的相互交换。在这些情况下，注意组分的特性和生物学概貌允许有批到批的一致性。

在药典标准步骤中用到的参考标准能够有效地把印在参考标准上的含量转移到质量标准。特定的情况下相对于 USP 的参考标准可作为 100%，测定药品的含量。在后来的 C. A. Johnson 喜欢陈述印刷的标准变成黄色与一个黄色参考标准不同。

修订委员会对每一个特定批号的 USP 参考标准的连续可接受性作出了相应的反应。每期药典论坛都刊出现有项目的列表，在这一方面迄今保有的收集品，同时指出哪些是新的、已删除的、或者是不能获得的。

参与

1. 食品和药品管理局

与 FDA，与科学家以及 FDA 的实验室、中心保持紧密联系，这些将继续是修订计划的一个特点。保持工作的紧密联系方法主要通过 FDA 药物评价和研究中心的药典标准操作事务部。事务部负责获得和整理机构对建议的评议，其作为与中心联系的一个官方点出现在 PF 上。他们能有效地提出许多改善工作的建议，也能有效地促进 FDA 和药典之间保持一致性。每个小组委员会都有一个特定的审核员，其是由 FDA 任命以确保交流。

在 St Louis MO 的国家药物分析中心在近三十年来在标准的修订中是一个恒定的、有价值的、合作性参与者。该实验室继前几轮进行了分析测定的扩展和复核工作。在这一轮周期，在已建立的和提议的新的 USP 参考标准的评价中，它将继续作为主要的 FDA 参与者。而且，对于许多协调方面的通则和议题给予了仔细审查。FDA 是科学数据和信息唯一的最有创造力的外部来源。

2. 工业界的合作

美国药典和工业界的科学家在许多重要领域相互发挥着作用^[13]。制药工业很重视质量，因此一个标准制定的主体的计划会得到普遍意义的关注。我们能够看到与许多工业科学家的接触：他们使用 USP 标准；作为一般修订委员会的成员；作为理事会的成员，也是上诉主体的成员和 USP 大会的代表。他们提出修订和审核修订的意见。他们是 USP 的顾问团，合作组织委员会和顾问。他们帮助建立 USP 参考标准。他们购买 USP 出版物和参考标准。这些当中，最重要的一条就是他们审视标准，与美国药典的初衷（图 1）保持一致。

2.1 个人的参与

几乎同等数量的工业界的科学家和学术界的科学家参与了制定 USP 和 NF 标准，20 个 DSD 执行委员会的成员中

有 10 个是属于工业界科学家。在最近的三个周期中 DSD 执行委员会的一半人员为工业界科学家。DSD 执行委员会是一个政策制定主体，其涵盖了许多方面的议题。药物技术是所讨论的内容中最主要的一类。其他参与者包括了政府科学家和医药开业者。

2.2 制造商的参与

工业部门也参与了顾问团，或者修订委员会。工业部门的参与除了针对 USP 和来自于 USP 的科学计划施加工业上的影响之外，还对每一个公司都有一个实在的时间要求。应着重进行大量的实验室工作以支持药物技术和分析技术写入 USP 和 NF 的专论。按经济价值来讲，所有其他的参与者都无法与工业完成的实验的成本相匹配。确实，在实验台前或生产现场做了多少决定其是否能在美国药典上出现。

不能认为 USP 完全只依靠某个厂家的意见，还有其他的团体。实验被认为对增补本是必需的，或者有助于厂家报告结果，或者争议的结果。USP 实验室测定了一些数据以使修订委员会能够决定建立或者修订标准。USP 并没有进行商业产品试验以决定是否符合官方标准。另外，如有必须要求 USP 做试验：①对于新的或者修订过的各论中的标准考虑到的实验方法；②当制订的发展和改进不能够从其他来源获得信息时为 USP 修订委员会测定试验样品以获得数据；③参与合作研究；④考虑作为 USP 参考标准使用的测试产品；⑤进行 USP 参考标准的降解测试。

3. 工业组织

美国药典的修订，特别是在新的通则和规定产品的分析测定方面，通过工业部门的积极参与不断发展。没有厂商在质量控制、统计和生物学方面的技术委员会的显著的贡献就没有近期药典的发行。仔细参考 PF 也将发现许多公司的科学家作出了贡献。可靠营养委员会（CRN）和消费者健康产品协会（CHPA）对方药的新标准也作出了贡献。多种维生素-矿物质合剂得到了进一步的发展，其在咳嗽和感冒各论中阐述，并具有大量的产品。

注射用药物协会（PDA）成员和委员会主要是在无菌产品、试验和环境方面的标准进行工作。

4. 自我管理

USP 的传统要素很少评论的一个方面^[13]是制药企业在我们的公开标准的过程中实行自我管理。自我管理是一种理念。对于在我们国家生活中的自由的人们和历史的前进，自我管理是一种自然的想法。然而，作为一种均衡的或者实际的原则，自我调节不可能直接产生，需要金钱、竞争的压力和不同的相对价格介入进来。对一个人来说明显改进的东西对另外一个人来说是一种不方便的或者不合理的损失。不普及的事业是不能写入最有共同性的工作之中的，特别是当雇主遭受雇员自我管理的损失时，更赤裸地说是遭受自由竞争。从这一点上讲，应记起上述谈到的广泛的



工业合作。该事实很明显，理解这里重述的美国药典的这个特征很重要。

获得自我管理理念所必须有的是能够转换个人努力的工具。该工具是一种中性的、但是权威的机构。当维持必要的职责时它能够隔离个人和把责任分散开。真正的见识能够对他们的自我管理的自然倾向起作用，但与所有的负面影响都保持者隔离状态。这就是为什么 USP 能够如此多产的主要原因，尽管它是一个小组织。

自我管理的实现是通过制度的转变，但也有另外的一种结果。它解释了为什么美国标准在实际上并不局限于“最小公分母”但却是“可接受的公分母”。虽然我们的小组委员会当涉及很多群体或默许一个群体时要争取一致的意见，但是 USP 标准正被引向更加理想的自我管理方向前进。一致同意并不是先决条件。

经常引证的是 de Tocqueville 的观察，其指出美国人喜欢联合以实现相互的目标而不用增加政府负担。这是受到我们的志愿主义精神的影响。始于 1820 年 USP 当然符合这种说法^[4]。然而，为什么贸易协会不能成为有效的自我管理的载体？所有与这些一起工作的人都知道当任何一个成员的既定利益受到严重威胁时就随时都不能实现。以最严格的意义讲是，需要一致同意。相同类型的专家，如果被选举为 USP 修订委员会的成员，就能够在最后基本阶段采取自我管理：他们能制定终端产品的标准而不用严格的一致同意。这是多数人投票决定的。正是 USPC 这种独特的性质才影响了这种转变。一切照常进行而没有增加政府的负担。

为了评价这种要素的影响，可考虑一下 USP 修订努力的页面数量。表 2 中给出了近几年 USP 活动数量的概况。每次这些药典的修订都涉及了工业的参与。问一问你自己：如果所有各方都不愿参与或者也没有一点积极参与的倾向，那么这么多的事情该如何进行？人们是如此倾向因为在这具有质量意识的工业时代里，人们需要标准，也因为大多数人愿意自我管理。

表 2 1990~2000 年的修订委员会

870	采纳新各论
23	采纳新的通则
270	删除各论
9240	药典论坛中提到的修订

国际关系

1. 国际协调

药物生产与销售的全球化现象已在 NF18 的辅料各论中已很明显，一直连续到所有的修订版直至产生 USP 24-NF19。

虽然 USP 的建立初衷是作为一个美国标准化药物组织，但现在 USP 及其产品与服务已为全世界所知和应用。在今天药物经济正处于跨国和多国化之中。USP 为了其生存，为了继续发展并成为一个受认可的领导者，需要成为一个强大的国际力量 and 影响力量。经济的力量正驱使主要的贸易团体相互联系以减少贸易障碍。管理着药物、器械等批准和销售的政府规定、法规和标准需要加以协调以整合程序（参见药典第二版中的药典标准协调）。鉴于有一个章节的同时期出版物，也在这里准备，这里只讨论正式出版的协议。

有两个组织涉及新的和修订过的标准的协调：药典讨论组（PDG）和国际协调会议（ICH）。主要的影响在这一个周期中再一次被归因于 PDG，其由 USP、日本和欧洲的药典组成。以国际为基础举行的联合公开会议对这里的每一个环节来说都很重要，因为这些保证了来自这三种药典的专家之间的直接联系（参见前述的“公开讨论和会议”）。

协调并不是一次性的事情，而且也不是文本内容的简单添加。在任何标准的协调努力之后肯定会剩下一些不协调的地方。很显然需要反复协调，这也是将来的标准。要把 PF 作为任何将来对协调主题或顺序的理解或跟踪的本质来源。

在美国药典的规定和 ICH 指导方针的规定之间除了授权的现状之外存在着一个严重的差异。USP-NF 的规定是由美国联邦和各州的法律法规执行的。USP-NF 标准给出了已经在医疗中使用的物品特征。形成鲜明对比的是 ICH 在处理新药方面叙述得很清楚，而在使用中的药物却不是这样。事实上的结果和应用上的广度两者存在明显的不一致。因此目前协调的目标在某些情况下并不能达到，因为为了保护大多数近来新批准的药物而破坏许多已建立的产品标准是缺少公正的。

2. USP 和 NF 在其他国家的使用

在北美之外使用 USP 的证据可以从 USPC 出版物（USP、增补本、药典论坛）和参考标准的众多订单中得出。反过来，国外科学家对现行标准质询，对药典论坛上的提议进行反复评论，也表明其视野不能仅局限于国内。虽然来自于国外的意见通过本国的会员传递给 USP，但是委员会通常只知道最初提出者的贡献。外国的科学输入是广泛的，在价值上也得到了与国内相同的对待。

USP 标准在国外使用的局限性来自于相对应的高科技水平的标准。仪器成本、实用性和维护会产生很大的壁垒，在这些国家对国外的交易是一个问题。对药理学家的培训以及工作安排也是一个限制因素。

药物信息分会从在特殊工种的众多候选者中挑选人员并提名。例如，1990~1995 年修订委员会的提名委员会从 1200 个候选人中挑选了 228 个人服务于 114 个工作岗位，这些人员代表了 45 个特殊工种。

顾问团有一个更积极的计划以鉴定来自其他国家较高资格的人。由于 USP DI 数据库在美国以外受到更广泛地了

解和使用, USP 通过使用 USP 药物信息的国家中物色人才, 对那些国家里信息的使用和数据库中药物使用情况提供建议。通过这种方式, 数据库能得到更充分以及能得到更多国家的使用。

其他药典

1. 国际药典

USP 已经与个别国家或不直接参与协调的药典建立了正式的会晤, 尽管实际效果可能是相同的。如上所述, 协调本身是本书第二版中的一个单独章节。

2. 加拿大

加拿大与 USP 有着特殊的关系。从 1954 年, USP-NF 在加拿大作为法定药典得到了官方的认可。在加拿大约 95% 的符合药典标准的药物依据于 USP-NF。USP 为其在加拿大的地位以及对加拿大人民的贡献而自豪。加拿大卫生医疗产品计划 (TPP) 和加拿大药学会的代表是美国药典会议的成员。健康保护部门和 USP 之间的关系是坦诚的。USP 寻求与 TPP 密切合作, 如同它与 FDA 合作一样。1995~2000 年期间, 六个加拿大人被选举为 USP 修订委员会成员, 45 个加拿大人被任命为 USP 顾问团成员。加拿大药理学科学家、医师、药剂师和其他医疗专业人士积极参与 USP 的工作。除了 USP-NF 是加拿大的官方认可外, USP 药物信息数据库 USP DI 涵盖了加拿大和美国市场上的所有药物。

3. 阿根廷、墨西哥和巴西

USP 与西半球的三个积极的药典编撰者进行讨论。在标准和信息方面, USP 科学家、业界人员和全体职员在会议和程序方面密切配合。这些成功的努力为促成与阿根廷, 以及随后的墨西哥和巴西在 USP 和西半球药典之间达成了初步的一致打下了基础, 作为对这些国家药典实施的帮助, 准许其用英语或者西班牙语使用 USP 或 NF 的一部分内容。采用同样的标准避免了协调的工作。加拿大、墨西哥和美国之间建立的北美自由贸易协议 (NAFTA) 的采纳刺激了双边的进程。

The Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 是墨西哥药典。在 NAFTA 的推动下, USP 和 FEUM 在 1993 年 1 月展开对话以寻求协调。最初设想在建立药典讨论组 (PDG) 的模式后每半年开一次会议, 现在已经接待五批来自拉丁美洲的访问科学家。

4. 中国

中国药典包含西药和中药两部分。在中国药典 (ChPC) 成立之初就有一系列访问和交流。USP 已经接待了来自中国的访问科学家, 并且有七位科学家各自有 4 个月的访问。

5. 国际药典

1900 年初, 世界卫生组织 (WHO) 接管了由国际联盟开始实施的计划, 该计划以布鲁塞尔会议的工作为基础, 重点在建立国际药典 (IP)。国际药典不同与国家和地区药典, 它在一些国家不是直接强制执行, 重点放在获得和使用现代化、自动化分析技术困难的发展中国家。国际药典为那些不容易获得更先进的技术的地方提供分析方法。WHO 的国际非专利权名称计划与美国命名委员会是等同的。数年来, 修订委员会的成员和 USP 的人员在药剂和抗生素专家委员会工作, 继续长期工作于 WHO 的药物质量计划。

按照章程第 41 条规定, 世界卫生组织在 1952 年出版了第一版国际药典。因为没有官方的代表作为委员会成员, 国际的药典被认为不具有法律效力, 但继续有法律特征。然而, 国际药典继续吸引来自许多国家的药理学科学家。国际药典定位于满足国家的需求而不是满足大的地区的需要。USP 必须与配备良好的分析实验室、技术先进的厂商、变化迅速和竞争性的市场、治疗策略、我们的期望、个性化的医疗服务相一致。相反, 国际药典寻求出版使用适宜技术的标准以适合中小型的质量控制实验室^[20]。世界卫生组织专家建立的药物鉴别和排除物质分解的基本检测方法是重要的和广泛的成果。供货商的资质计划也得到了出版。

出于便利的考虑, 颜色试验在北美不在分析项目中, 但分析仪器已列入质量控制实验室的预算范围之内。然而这一举措不一定适合世界的许多其他地方。那些国家对国际药典的关注对公众所接受的药品质量作出了重要的贡献。为了帮助实现这个目标, 世界卫生组织已经为人员和设备提供了详细的指南, 并帮助小型、中型和大型的分析实验室逐步提高技术和检测仪器^[20]。

现在国际药典的范围继续以 Wicniawski^[21] 定义的那样, 即提供药物的质量规范和剂型的一般要求。因此, 国际药典并没有出版单个剂型的各论。世界卫生组织领导打算在国际药典里包含将来的剂型, 但是在这里无法更确切的叙述。第三版的三卷给“主要的”的药物提供了标准^[22]。

6. 欧洲药典

欧洲药典优先于所有的欧洲国家的药典。

7. 英国药典

英国药典与 USP 之间有许多相似之处。在起源、持续的商业特征以及长期的合作历史使两者在重要的细节方面能紧密的联系。两者都是法律文件, 都在国家的法律中较之创始时得到更多认可, 都对制剂和原料药制定了标准。两者都在标准的所有发展阶段使用了来自工业、学术界和政府的专家。同时, 在大部分历史过程中, 英国药典也不是一种直接由政府资助的。

8. 其他国家的药典

有的国家药典是由政府建立以符合由地方提出的标准



需求。一些近期出版的版本就是很好的例子。但是它通常难以找到美国书商做这些工作。出版的城市有柏林、巴黎、布拉格、罗马、东京、北京、首尔、斯图加特和台北。大多数国家要求引进一些条款要求以符合一种或多种更广泛被认可的药典，例如，USP 药典或英国药典。

9. 在其他国家 USP 的产品和服务

自从 1982 年以来，USP 已经在其他国家发行以更直接地满足当地顾客的需要。在德国 Eschborn 的 Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker [德国药剂师协会中心实验室 (ZL)] 是第一个发行商，目前为欧洲和中东的客户服务。最大的发行商是 Promochem GmbH，其总部在德国的 Wessel，分部遍布欧洲。英国制药协会在整个英联邦发售参考标准。日本药典协会在 1991 年成为一个发行商。在加拿大，至少有两个公司发行参考标准。发行商的信息会在药典论坛中每两月一次的参考标准目录中出现。

10. 国际发展机构

1992 年，USP 和国际开发总署美国分部 (USAID) 签署了一项合作协议，目标是协助发展中国家建立药学管理（包括采购、保管和分配）和控制（包括国家明确的处方集和药物信息资源）计划。该计划是由 USAID 和 USP 共同资助。

11. 美国的商业部门

在 1992 年，商业部 (DOC) 建立了美国特殊商业见习和训练规划 (SABIT) 以培训来自新独立国家 (NIS) 的科学家。按照 USP 中一个文件，在 USP 访问科学家计划下，DOC 提供经费给六位俄罗斯科学家以在 USP 药物研究和测试实验室学习药物分析技术。目前有二位科学家已经各自全部完成了 4 个月的培训。这些科学家将来工作的实验室将会建立在莫斯科，并且由世界银行赞助。药物有效与安全的国际基金 (IFDES)，一个在俄罗斯、瑞士、德国和美国法律特许下成立的非营利组织，志愿与 NIS 一起工作以帮助他们重建药物供应管理和质量控制计划。

参考文献

1. The United States Pharmacopoeia, 24th Rev. The National Formulary, 19th Ed.; The United States Pharmacopoeial Convention, Inc.; Rockville, MD, 1999; Both Official from January 1, 2000
2. Rules and Procedures of the General and Executive Committees of Revision for 1995–2000. Pharmacopoeial Forum 1995, 21, 1619.
3. USP, 24th Rev., xxxvii–xiii.
4. Johnson, C. A. The Purposes and Limitations of a Pharmacopoeia. International Symposium on the Compendia and Industry, Montreal 1985; Pharmazeut. Ind.; 1986; 48, 760.
5. Grady, L. T.; J. A. Pharm. Assoc. 1976, 16, 603, NS
6. Boorstin, Daniel J. The Americans—The Democratic Experience; Chap. 22, Random House; New York, 1973.
7. Descartes, R. Discourse on the Method; L. J. Lafleur transl. 1637.
8. Added Substances. Ingredients and Processes; USP, 24th Rev., General Notices.
9. Tests and Assays—Procedures; USP, 24th Rev., 7 General Notices.
10. USP, 24th Rev., General Notices.
11. Grady, L. T.; Pharmazeut. Ind. 1983, 45, 640.
12. King, R. H.; Grady, L. T.; Reamer, J. T. J. Pharm. Sci. 1974, 63, 1571.
13. Grady, L. T. Cooperation between USP and Industry [see Ref. 5].
14. Heller, W. M. Private Communication.
15. Florey, K. Reflections of a Quality Control Watcher. Progress in the Quality Control of Medicines; Deasey and Timonesy, Ed.; Elsevier Biomedical Press; Amsterdam, 1981; 15.
16. Stainer, C. Ceremony of the Presentation of the European Pharmacopoeia; Council of Europe; Strasbourg, France, 1969; 1, 5–71.
17. Schorn, P. J. International Harmonization of Pharmacopoeial Standards [see Ref 5].
18. European Pharmacopoeia, 2nd Ed.; II. 10th Fascicle; Council of Europe; Strasbourg, France, 1986.
19. Sagath, J. Proceedings of the International Meeting on Pharmacopoeias and Quality Control of Drugs, Cingolani, E., Ed.; 228 Annali Istit. Super. Sanita 1975, 11, 228
20. World Health Organization. WHO Technical Report Series; World Health Organization; Geneva, 1984.
21. Wieniawski, W. Proceedings of the International Meeting on Pharmacopoeias and Quality Control of Drugs, 204–210.
22. World Health Organization. The International Pharmacopoeia, 3rd Ed.; World Health Organization; Geneva, 1988.

(乐健 简海龙 译)

Y

药典标准：日本药典

Mitsuru Uchiyama

Japan Pharmacists Education Center, Tokyo, Japan

引言

日本药典(JP)的产生可追溯到1886年。它提供了官方标准和测试方法,用于管理重要的医疗药品的特性与质量。一般来讲,JP中的标准不仅影响到JP中收录的物质,而且影响到在日本流通的所有药品和相关产品。JP应用于药品生产前与生产后的所有阶段,包括研发、申请、评价、销售、检查和使用。JP在保证和改善药品质量方面扮演了一个重要的角色。因此,为了使药典中的标准用于药品质量的保证能可信可靠地被认可,药典的修订就必须在一个未受任何团体的偏见和不正当影响所左右的机构与系统中进行。

框架

目前JP由卫生福利部(Ministry of Health and Welfare)通过按照药事法规办事的中央药事理事会(CPAC)的JP委员会出版。该JP委员会包含一个由12个顾问团成员组成的小组委员会,每个成员专门研究一项内容修订原则、药物的选择、化学药品、生物制剂与生物制品、一般测试方法、物理测试方法、生物测试方法、制剂、天然药物、命名法、药物辅料。

顾问团成员都是来自于国家研究机构、大学和地方实验室的科学家,由卫生福利部每两年指定一次。按照规定,顾问团成员不得连续担任8年。这12个成员中有10名具有来自于工业部门的一定数量的联络员。负责命名法和药物选择的成员并没有联络员。

JP秘书处是卫生福利部医药安全局(Pharmaceutical and Medical Safety Bureau)的评价许可处的一部分,秘书处的工作是在国家研究所保健科学(NIHS)的科学技术支持下进行的。医药安全局是一个新的组织,其在1998年7月成立,是以前的药物事务局(Pharmaceutical Affairs Bureau)的重组结果。CPAC为响应政府办公室的进一步重组,将在2001年1月停止运行,并将作为负责药物与食品卫生事务的理事会恢复运行。

修订过程

1. 修订周期

药事法规规定JP至少每10年修订一次。然而在1967年开始,由于医药研发的快速发展与变化,JP的修订周期

减少到每5年修订一次。因此,第11版和第12版分别在1986年、1991年出版,最近的版本即第13版于1996年4月出版。英文版本也紧接着发行。在日文原版与翻译的英文版之间存在差异时,以前者为准。JP的英文版可通过Yakuji Nippo公司(日本东京101-8648 Chiyoda, Kanda Izumicho 1)获得^[1]。

JP历史上的第一版增补本在第11版出版两年后于1988年10月出版。在1993年10月和1994年12月卫生福利部又分别对第12版出版了增补本。对于第13版,分别于1997年12月和1999年12月出版了第1版和第2版的增补本。第14版已于2001年4月出版,第15版已于2006年4月生效。

2. 修订原则

目前JP修订的最基本目标和最重要的考虑之处,也就是评价新药质量应遵守的目标和考虑之处,是要获得药物质量的一致性,但不一定要求更高的纯度,以对消费者提供最大的利益。叙述的内容至少应有充分的鉴定和保证足够的质量,分析步骤应准确、容易操作。然而,在分析时应在准确与容易操作之间维持一个适当的平衡。虽然并不一定要有极高的准确性,但检测限或者定量限以及纯度试验中的回收率,都应通过足够的数据验证。应避免有毒害化学试剂,把动物试验减少到最小限度。

3. 修订过程

JP各论或试验方法的修订申请可以通过医药安全局的JP秘书处经任何有关的个人或组织提交。申请的各论,或者是为了新的收载或者是为了修订,由一个顾问或者工厂专业人员起草。新的或者修订测试方法以类似的方式处理。为了实现这个目的,顾问成员受到了以下组织的帮助:日本东京和大阪的制药厂商协会、日本药物辅料理事会、东京天然药物协会、日本天然药物协会联邦、日本医院药剂师协会。

起草的专论由药物化学方面的两名顾问进行审查。顾问I采用新的收载方式,而顾问II修订现有的专论。传统药物和药物辅料的草稿分别由天然药物顾问和药物辅料顾问审查。命名法和化学结构一旦在草稿的各论定稿之后由命名法顾问审查。三种普通测试方法(化学、物理和生物)和试剂的添加或者更改交由每种测试方法相应的顾问审查。

参考标准的建立是在有关顾问适当考虑NIHS——其与日本药典协会合作,直接负责建立那些参考标准——的观点之后建议采纳的。日本药典协会(日本东京150-0002, Shibuya 2-12-19, Shibuya)是一个非营利性的私人组织,

其支持 MHW 对药品的管理与调控。该协会扮演了多重角色，特别是制作多种参考标准，包括药典参考标准的一部分。它也发行药典和有关信息性文件，例如，JP 论坛（JP forum），召集公共会议和年会。

4. JP 论坛

在每个顾问终审之后，所有的修订草稿都通过 JP 论坛——一个告示与评论的媒介，征询评论向公众公开^[2]。JP 论坛由日本药典协会在 JP 秘书处的赞助下每季度出版一次。JP 论坛最初于 1992 年 1 月作为地方和国际交流媒介出版。它将继续为 JP 提供更开放的修订过程，并且通告修订内容以及 JP 委员会将来的方向。JP 论坛在日本发行，主要是为了国内使用者，与国际团体和评论有关的论文将以英文形式与日文版本一起发行。因此，我们可以期望 JP 论坛将有助于国际协调进程，并将促进加深对 JP 的理解和信任。

在对评论进行分析讨论并做出相应的修订后，修订过的草稿由日本药典委员会进行审核，然后由中央药事理事会执行委员会审核，最后才在 JP 出版。

5. 时间期限

在日本，新药被批准之后，其第一篇各论通常是直到被重新评价的结果出来之后才会出现在 JP 上。目前一个新活性成分的重新评价期限一般是在批准后 6 年。重新评价期的需要是要确保新药的安全有效。对于特别的药物，如用来治疗罕见病的药物，其重新评价的期限是在批准后的 10 年。

另外，并非所有的新药都列在 JP 中。药物选择顾问依据治疗的重要性来决定哪种药物应该列在 JP 上。考虑到把新药列在 JP 上将会引起该药不注册品牌的介入，所以有时药物发明者不愿将其列入。结果，JP 上的各论较美国药典—国家处方集（USP-NF）少。JP 13 含有 1292 篇各论，其大约是 USP-NF 中的 1/3。

JP 的大小、范围和内容介绍

JP 是含有 2 个部分的单卷本。JP 13 第一部分含有 824 个广泛使用的药物及其制剂的各论，其中有 532 个为有机和无机化学成分，187 个为制剂（单一成分剂型）、91 个为抗生素，11 个为放射性药物，3 个为药用气体。第二部分有 468 个项目，其中 106 个为混合制剂，132 个为药物辅料，172 个为传统（天然）药物，30 个为生物制剂，21 个为植物或者动物来源的杂项物质，7 个为外科敷料剂。除了这些专论外，JP 中还含有重要说明、规则、标准、测试方法，以及专论中一般会使用到的仪器等。JP 还收录了 131 个对照品。

JP 中一般注意条款下给出了一些术语的定义，例如：

（1）标准温度、普通温度、室温、微温的定义分别是指 20℃、15～25℃、1～30℃、30～40℃；

（2）“真空”的含义是指除另有规定外，不超过 15mmHg 的压力；

（3）粉末化药品的粗度表和细度表；

（4）在各论中，某种成分通过含量测定测定的含量上限，如果没有规定，而只写不少于一定的百分比，系指上限为 101.0%。

JP 剂型各论中有一个部分是关于建立在制剂通则——其含有 28 种不同剂型的定义、制剂方法、储存等方面的信息——基础上的制剂方法方面的内容。不溶性颗粒物质试验，作为注射剂部分中的一个小部分，目前为达到国际协调的目的正在药典编辑者之间讨论。

一般试验、方法、仪器部分含有 60 种试验方法，如荧光光度法和电位滴定、溶出和崩解试验、含量均匀度、细菌内毒素试验、定性试验、试剂和试液、标准溶液。124 种化合物的红外参考图谱包含在附录中，并将在以后的版本中更新。

JP 各论由药名、性状、鉴别、理化性质、纯度组成，如果需要，也有特殊试验、制剂测定和含量测定。JP13 的专论中没有抗生素、生物制品、放射性药品方面的内容，然而，它们可以在 Japan 1993 抗生素制品要求（以前日本抗生素制品的最低要求）和相应的标准中找到。

日本药品的非药典标准

除了日本药典之外，日本的药品还出版有其他简要标准、指南作为日本的药品标准。以下是一些在上述提到的药品测定的临时标准，但这些标准都是强制性的。如上所述，以下标准中的一些各论在 JP 中得到了引证：

- Japan 1993 抗生素制品要求（为与 JP 结合在一起，抗生素物质已包含在 2001 年发行的 JP14 中，抗生素制品将编入日本药物法典中）；

- 生物制品最低要求；
- 血液制品最低要求；
- 放射性药品最低要求。

有一些标准是药物事务局的建议出版的，是为保证和改善药品质量制定的非官方标准。由于这些标准是非官方的标准，所以与 JP 并不重复。

- 日本药物法典，其含有 682 篇活性成分和 175 篇药物制剂方面的各论^[3]；

- 日本药物辅料，其含有 206 篇药物辅料方面的各论；
- 天然药物标准；
- 临床诊断原料标准；
- 体外放射性药品指南；
- 杀虫剂标准。

药典在管理中的含义

虽然药典标准和药品质量法规的目标都是为了保证药物的质量、有效、安全，但他们之间的基本政策却不一致。



Y

JP 委员会和管理机构之间将在法律和其他方面继续密切联系以建立更加协调的关系。JP 秘书处也属于相同的管理新药批准的卫生福利部底下的医药安全局。JP 委员会的一些成员也是 NIHS 的成员，其共负的责任的一部分是新药应用审评 (NDA) 和建立 NDA 技术要求指南。当 JP 修订时，这些指南都要修订。经验表明 JP 和指南的修订可以容易地由一起工作的管理机构同步进行^[4,5]。

1. NDA 档案与药典的一致性

在 NDA 程序中，规范和方法学应尽可能地建立在 JP 中的条目基础上，并密切注意 JP 中使用的术语。原则上，在建议的方法学中使用的试剂、试液和试验仪器应与 JP 相同。如果与 JP 不同，那么它们的质量、公式、图表、尺寸等应附在一张与 JP 中这些项目的条目相一致的纸上。如果使用的参考标准在 JP 中没有规定或者没有被 NIHS 指定，那么还应附上规范和试验方法的详细内容。

2. JP 的修订如何影响市场中的药物

如上所述，药典的内容对于所有药物都是强制性的，不管它们是否列在 JP 中或者作为新药正处于评价之中。因此，JP 的修订将极大地影响那些药物的标准。JP 的修订对于已在市场上销售的产品有三个方面的影响：

(1) 如果建立了一篇新的药典各论，那么某个药物的 NDA 持有者应申请允许其改变经核准的项目，如规格和试验方法，以保证该新药满足药典专论的要求。对于那些已在市场上销售的产品在目前的法规之下允许其用一年半的宽限期去满足新的药典标准的要求。

(2) 标准中规定的含量、性质、试验方法、纯度限度无论何时得到修订，目前在流通领域中所有的有关药品都应符合 JP 中新标准的要求。制造厂商应负责确保它们的产品符合新标准的要求。如果这些产品不符合要求，那么制造厂商应在一年半的宽限期内使它们的产品质量标准达到新标准的要求。

(3) 当凡例、制剂的通则、“一般试验、步骤和仪器”中规定的试验仪器和试验条件中内容有更改时，以前批准的药品在有些情况下就不再符合规定。例如，如果在固体制剂的崩解试验中使用的媒介的 pH 改变，某些药品在新的 pH 要求下就可能产生不同的结果。在这种情况下，建议对制剂进行部分修改以确保该制剂在新的试验条件下能够符合规定。这些情况对于日后的一般试验方法的国际协调偶尔会造成障碍。有必要采取规定的测量法以克服这些障碍。

国际协调

1. 在国际协调会议 (ICH) 上药典的任务

JP 的编辑者现在是国际协调的一部分，其与美国药典和欧洲药典的编辑者一起进行协调。在 ICH 的初期，药典

是专家工作组 (EWG) 的主题。然而，药典的协调应努力促进药品的国际流通，并改善药品的质量，而不是仅仅促进新药的批准而已。而且，药典讨论组 (PDG)，由欧洲、美国和日本药典编辑者组成，于 1989 年成立，比 ICH 成立的时间还早，现在定期并与 ICH 同时举行会议，调查与药典有关的大范围问题，和按照长期的工作进度表协调所有的各论规范和一般试验方法。PDG 赞同 ICH 指导委员会的观点，认为最好在每次 ICH 会议上定期提供进程报告，而不是只把它作为 EWG 的议题而已。

2. PDG 的方针

为了制定协调计划日期，和重要的一般试验方法一样，PDG 把能在许多新药中用到的主要辅料的各论提到了一个较优先的位置。PDG 已建立起协调的一般方针，指明协调的目标是要在方针、标准、各论、规范、分析方法和药典接受标准等方面达成一致。然而，PDG 也认识到并不是总能达到这样的一致。在不能达成一致的地方，协调意味着在目标的相似性方面达成一致，并明确表述任何的差异。因此目标是协调而不是一致^[6]。

在分析方法的协调中，理想的方法是建立一个满足了所有药典验证标准的方法。然而，这总是不可能实现的，因为在每个国家的技术环境之间存在了许多不可避免的差异。当不同的试验或方法产生了相同的结果时，在这三种药典中就已规定允许有替代方法。在这些情况下，替代方法就应通过与标准分析步骤做比较来进行验证。

没有简要标准和方法学的协调，新药质量的协调无疑是不能达到的。PDG 将继续以它所认为的对药典协调是正确的方法进行协调，和为新药、新产品的质量的有效协调做出贡献。

3. 相互协定

在许可过程中，每个管理当局有必要对那些已被 PDG 协调和作为有效方法的试验步骤认作是等同的。该概念在 1995 年已包括在日本“涉及新药申报的 B 部分文件准备的指导方针”里面，在其声明中指出：“在日本药典和其他标准以及那些已通过国际协调认可的标准中的分析步骤应被认为是有效的方法。”

ICH 在 1999 年 10 月 6 日的 Q6A 规范的第四个阶段的指导方针指出与药典有关的内容为：

某个步骤的参考品在每个区域的药典中均有。无论什么情况下均应利用合适的药典步骤。然而在各区域之间，药典操作步骤和（或）接受标准之间存在着差异时，只有这些步骤和定义的接受标准在所有区域都可被管理当局接受时，才有可能有协调的规范。对于在新药物或新药品规范中一般考虑的几个属性，指导方针的有效性取决于药典操作步骤协调的成功实现^[7]。

这样，协调的重要目标只有当 PDG 能够达到相互认可的标准和试验方法——其对于相同的样品，即使使用了不同的规范、步骤或者试剂也得出了相同的结果时才能达到。

我们应继续采取必要的措施加深国际合作，并使用 PDG 作为药品质量协调的论坛以获得协调的标准和方法学。

结论

本章描述了 JP 标准的发展、国际协调及其与日本药品管理程序的关系。它也指出了 JP 在确保和改善日本药品质量上扮演了基本的、最主要的角色。每个国家的药典必须为国家的药品质量标准组建基本的技术基础和把更好的药品以最高的效率提供给公众以促进公众的健康。任何药典的角色不仅是在标准、试验方法和接受标准的基础上为药品质量控制确定目标，而且也为实现药品管理的国际协调提供方法。

参考文献

1. Society of Japanese Pharmacopoeia. The Japanese Pharmacopoeia, 13th Ed.; Yakui Nippo, Ltd., Tokyo, 1996; <http://www.yakuji.co.jp>.
2. Society of Japanese Pharmacopoeia. Japanese Pharmacopoeial Forum; Society of Japanese Pharmacopoeia; Tokyo, <http://www.sjp.or.jp>.
3. Society of Japanese Pharmacopoeia. Japanese Pharmaceutical Codex 1997; Jiho, Inc.; Tokyo, <http://www.jiho.co.jp>.
4. Pharmaceutical Review System Study Group, Ministry of Health and Welfare. Pharmaceutical Administration in Japan, 9th Ed.; Yakui Nippo, Ltd.; Tokyo, 2000; <http://www.yakuji.co.jp>.
5. English Regulatory-Information Working Group. Pharmaceutical Administration and Regulation in Japan (1999-12); Japanese Pharmaceutical Manufacturers Association; Tokyo, 1999; <http://www.nihs.go.jp/mhw/koukai/1999/yakuzi/version5e.pdf>.
6. Pharmacopoeial Discussion Group. Policies for Harmonization of the Three Pharmacopoeias. Japanese Pharmacopoeial Forum 1995, 4 (4), 65-67.
7. ICH Expert Working Group, Specifications; Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products; Chemical Substances; ICH Steering Committee; October 6, 1999; <http://www.nihs.go.jp/dig/ich/qindex-e.html>.

(乐健 简龙海 译)



Y

药典标准的协调

Lee T. Grady

Jerome A. Halperin

United States Pharmacopeia, Rockville, Maryland, U. S. A.

引言

自 1906 年以来, USP 和 NF 标准中的剂量、质量、纯度、包装和标签都要经过美国食品、药品和化妆品法案以及修正案的认可, 其执法机构是负责药品协调的美国食品药品监督管理局 (FDA)。

虽然 USP 最初成立的目的只是对美国本土的药品进行标准化, 但是现在 USP 及其产品和服务已经为世界各国所熟知和采纳。如今药品经济正处于转变和全球化之中, USP 在这时更具有生命力和国际影响力。众所周知, 经济促使主要贸易团体相互合作以减少贸易壁垒, 而这种合作的做法就是将政府管理药品、器械等产品的审批和交易等方面的要求、法规和标准进行协调统一。USP 的使命就是通过合法地建立和宣传由医药专家、患者和消费者认可的质量标准、药品使用信息以及有关事项来促进公众的健康。

USP 的使命并不局限于美国本土。几乎从 1820 年 USP 创立之时, 它就为人们所知, 并对各国政府、专家机构在制订和执行自己的药典标准时产生影响。USP 从前的这种国际化方式现在已经发展成一项正式的、仍在进行的工程, 这一工程表现在与欧洲、日本的药典协调统一, 与阿根廷、巴西和墨西哥药典达成一致。目前开展药物信息的国际化项目的还有一些多国组织机构、外国政府和专家团体。

从事药品的注册强烈要求药典的协调统一。换句话说,

在药典协调统一之后, 药品就能够在本地区以外的地方注册, 而不再需要进行重复性的研究和试验。因此, 在药典协调统一之后最主要的受益者是国际性的公司。但是, 药典的协调统一促进了现有的、特别像辅料这样的商品的商业国际化。

1. 全球化

20 年以前, 在美国使用的药物和制剂大部分都是在美国制造的。在全球化之前, 由于种种原因, 严峻的环境形势迫使美国不再进行化学原料药的生产; 而且, 其他国家对于制药工业提供了低税收的条件, 从而吸引了一些厂商把工厂建在这些国家。但这些都不是全球化。全球化是这个时期全世界最重要的历史趋势。它的特征包括整个国际商业结构、资金与专门技术的全球化分配。从这一角度讲, 制药业与其他产业之间并没有明显的不同之处。在今天, 药品或者生物制品的开发可以发生在美国、欧洲或者几个合作的国家, 但是没有一个国家可以作为某个特定药品的创造者。另外, 国际性公司也偏爱生产销售在全球范围内数量最少的制剂。但是制剂的注册相当复杂, 比如不同的药典对不同配方的制剂有不同的分析方法, 而协调的最终目的是使统一后的药典标准必须能被不同地区的注册主管当局认可。药典标准的差异有可能会被利用成为贸易上的技术壁垒。

表 1 国际药典公开大会名单

会议	地点	时间
国际协调辅料标准的联合药典公开大会	美国佛罗里达州奥兰多	1991 年 1~2 月
协调生物技术产品标准的国际药典公开大会	意大利维罗纳	1993 年 4 月
第二届国际协调辅料标准的联合药典公开大会	美国佛罗里达州圣彼得堡	1994 年 1~2 月
关于无菌/防腐剂的联合药典公开大会	西班牙巴塞罗那	1996 年 2 月
关于剂型和药物技术测试方法通则的国际协调会议	西班牙塞维尔	1998 年 10 月

2. 替代方法

美国药典、欧洲药典 (EP)、日本药典 (JP) 这三方药典都允许能够按照法定的药典方法进行试验的实验室采用替代方法进行试验。选择替代方法的目的通常是为了更快、更方便或者更节约, 并且当新的或者修订后的药典方法出

现时, 它可以更好地将其与业已存在的数据库进行融合和过度。在这种情况下, 一个实验室可以验证其他药典上的方法, 因而避免了常规分析的重复工作。但在执法或者有争议时, 以上三方药典均规定只有药典收录的方法才能应用。协调的一个重要作用就是要避免在不同国家地区间的药品国际化注册和其他方面要求的重复性试验。



我们都应该支持国家和国际团体这一级别的药典协调，也都应支持辅料的协调和普通试验与试验方法的协调。在完成上述目标时，人们应偏好有实用价值的而不是适用范围极窄或者通用性最差的方法。困扰国际协调大会的最大难题就是要努力与前瞻性协调理念相一致。

对药典协调的支持主要来自于与日俱增的、并非协调工作的合作和贡献。协调只占用了药典相应部门中极少的时间和资源，他们还有许多别的事情要做。一个很明显的例子就是药典标准适用于已经在市场上销售的品牌药和普通药的检验。

协调具有三方面基本意义。首先是促进国际贸易的发展，其次是促进药品在多个国家注册过程的简化，最后是减少重复性试验的成本。对每个国家来说，促进注册任何一个新药是一次性的事情，但时国际贸易的促进和重复试验成本的减少则贯穿于一个药品的生命周期。

药典的协调具有挑战性。各国药典的历史差异使各国药典的现状存在着差异，其中影响因素有很多，主要包括内容、语言、法律、效率以及标准的使用者。美国药典还会在公共药房和医院药房中使用，因此，标准的制订应与那里的环境相适应。

药典也有不协调且需要协调的地方，例如热原试验需要重复地使用兔子来多次测定，而细菌内毒素试验却有另外的规定。这是方法不协调的最极端的例子。但有一种协调性更差的情况，即在判定样品是否符合规定时会得出不同的结论。在这种情况下，质量控制的专业人员必须判断该样品是否能在一个地方或多个地方销售。不协调的消除在作用上等同于协调统一。由于政策上的差异，药典在载试验方法上会有区别。如果某药典为了维护消费者的利益必须采用某种试验方法时，该药典就可以不再参考其他地区的药典。

3. 对照品

对于协调的讨论大多数围绕着辅料或者常规试验和含量测定，但是，即使使用相同的方法，如果对照品不同，结果也不是最理想的。事实上，在过去的10年里，对照品的协调统一先于其他方面的协调统一。药典和世界卫生组织在以前就共用很多相同的原料均来制订各自的对照品。如果药物以高纯度的晶体形式存在，不同实验室间得出的测定结果没有差异，那么对照品的差异就是管理和法律上的差异。但是对于混合物，情况则不一样。例如，抗生素标准品是基于不同的微生物试验方法建立起来的。激素的标化是最早的对照品标化项目之一。

生物转化技术使人们对基于同种原料的标准品重新给予关注，因此，有可能建立全世界统一的配方、分析方法和标准品。但情况有时会比较复杂，例如对于胰岛素，市场上同时存在着生物转化技术的胰岛素和动物来源性的胰岛素。

协调的历史

美国药典委员会最早进行国际协调的一个例子可在美

国药典（1851年）第三修订版^[1]的历史介绍中看到：“出于介绍一致性的目的，我们的药典与新出版的都柏林药典和伦敦药典进行了比较并且不排除可做必要的修改。”要注意的是，当时一致性并不是各方所必需的。

1848年美国通过了药品进口法案，法案规定进口到美国的药品必须符合出口国的标准和美国或者欧洲主要药典之一的标准，因此修订委员会意识到使本国药典紧跟最新发展的重要性，在1851年这种意识得到了增强。美国海关部门在主要港口城市建立了实验室并且根据申报的标准对进口的药品进行分析。由于许多美国人到国外留学，他们与欧洲药品的联系一直很紧密。

把药典标准的协调统一作为一件实事来做源自1865~1910年^[2]举办的国际药学会，但正式的尝试最早可追溯到1902年。USP总裁Horatio C. Wood博士和伦敦威廉化学研究实验室的美国化学家Frederick M. Power博士被美国国务卿任命代表美国政府参加剧烈药物（heroic medicine）统一配方的国际会议，共有19个欧洲和北美国家参加该会议^[3]。第二届会议在1918年举行，第三届在1925年举行，除亚洲和澳大利亚之外全世界共有31个国家参加了这次会议，会议起草了一个新的“国际协议”，并于1929年执行。第三届会议对1902年的77种“剧烈”药物协议进行了修订，并引入了最大剂量的概念。它还要求国际联盟创建一个永久性的药典秘书处^[4]。Andrew G. DuMez博士代表USP并被美国公共卫生局正式任命代表美国参加了这次会议^[4,5]。国际联盟的专家委员会计划在1938年举行第三次会议，但由于第二次世界大战的爆发再也没有召开过^[2]。

药典修订的其他方式还有在国际药学会的各委员会之间进行信息交流。USP修订委员会主席Joseph B. Remington博士作为美国制药协会的代表参加了1913年在海牙举行的会议，他建议成立一个国际信息局以便能够给每个国家的药典修订委员会提供信息和管理一个检测实验室。一个以Remington命名的委员会负责执行这个由来自瑞士伯尔尼的Alexander T. Schirch教授提出的计划^[6]。

拉丁美洲

1905年，USP为了建立与中、南美洲的对话，通过与古巴哈瓦那大学药学院教授和院长Jose Guillermo Diaz博士达成协议，对要求出版西班牙语版的美国药典做出了响应。对这个计划的支持可能来自于1905年第二届美洲共和国国家的国际卫生大会的决议，决议中有一部分这样写道^[3]：“毫无疑问，把美国药典翻译成西班牙语对于参加本次大会的来自每个共和国国家的医学专家和药剂师来说都将大有裨益。”

USP VIII的西班牙语版在1908年出版。它被古巴、波多黎各和菲律宾采用。代表哥斯达黎加的Joaquin Bernardo Calvo在1910年的大会上做了如下发言^[3]：“美国药典译成西班牙语提供给那些不讲英语的医师和药剂师；它是迄今

为止出版的、即使不是最有用的药典也是最有用的药典之一。”西班牙版药典持续出版到 1955 年 USP XV。USP XI 的西班牙版本被哥斯达黎加首次用作法定的药典。

然而,在 1960 年大会上,秘书 Adley B. Nichols 在他的报告中指出^[7]：“西班牙语版美国药典的发行情况已经在相当长的时间内不能令人满意,特别是 USP XV。这是因为没有一个国家再对西班牙语版有强烈的需求。很显然,英语在今天已经被充分地广泛地应用,人们可以随时使用现成的英语版美国药典。”或许对于 USP 出版西班牙语版本的原因用修订委员会主席 Charles H. LaWall 博士的话来概括最恰当不过:“西班牙版的发行对于大会来说或许永远也没有经济效益,但作为一种爱国义务并且为了认知那些讲西班牙语的美洲国家对该药典的仍在使用,我们仍应继续出版。”

西班牙语版美国药典在 1995 年再次出版,自那时起发行半年刊增补版。这可能是使用了“计算机翻译”技术。如今两种版本的药典仍在混用,但英语版在拉丁美洲继续保持着它的重要性。

对药品质量标准协调的现代论坛

1989 年 5 月在美国的弗吉尼亚州威廉斯堡召开了 USP 公开大会,之后关于协调的论坛很快就诞生了^[8]。当时会议的结论是必须对辅料进行协调统一,并且有可能的话对分析方法进行协调统一。这种观点在 1989 年召开的两次国际会议上均被提及。第一次是 6 月份在法国的斯特拉斯堡庆祝欧洲药典成立 25 周年^[9]。第二次是 9 月份在日本的东京,由东京和大阪的制药协会主办,会议的主题是药品质量和 2000 年药典的作用^[10]。在这两次参加人数较多的大会上,行业代表提出需要对代表了世界上主要药物研发和生产地区的美国、欧洲和日本的药典中的标准进行协调统一,以促进国际制药业的贸易发展。

在那些大会上提到的药典中最需要协调的部分是药用辅料和分析测试方法。辅料是商贸化的最大障碍,这是由于美国药典、欧洲药典和日本药典中相关的标准仅是由一小部分的通用化合物和世界上普遍存在的动物、矿物和植物来源的许多天然产物拼凑起来的。这些常见化合物的标准反映了文化、科技和时间上的差异,具体表现在这些标准是如何建立、何时建立以及最后修订的。同样,这三方药典简述的分析测试方法间的差异将经常导致符合某一药典章节规定的某个物质不一定符合另一药典章节的规定。导致在测定同一指标时,如果采用了另一种分析方法,经常会由于操作步骤不同致使实验室固定设备、时间、资源以及训练有素的分析人员的浪费。

药典讨论组

1989 年 9 月,在东京建立了“四方小组”,即药典讨论组(PDG)。PDG 最初由 BP、EP、JP、USP 四方的代表组

成,现在由 EP、JP、USP 组成。PDG 在 1990 年 3 月于美国马里兰州 Rockville 的 USP 总部举行了第一次会议,会上共达成了几个重要协议:

- 由来自各药典的高级执行官员和科学官员组成的小组每年会晤两次。

- 贯彻在东京会议上达成一致的前瞻性协调概念^[10]。前瞻性协调具有三个特征:方法的优选应注重未来可被接受的方法;保留任何对某方药典具有意义的标准;不禁止某方药典单独试图获得最新发展的任一药典已收录的技术。

- 增加了协调的另外两个概念:①预见性,即在各国药典标准之间的矛盾出现之前就尽量避免其产生;②回顾性,即解决药典标准之间现存的矛盾。

- 在有待协调的候选品种及其先后次序的选择上充分征求制药企业和政府管理机构的意见。

- 召集公开的国际药典大会。

把协调的这三个概念表达清楚非常重要。预见性和回顾性的概念阐明了两者的差异:即建立药典标准(该标准并不存在或者在各药典中很少见到)时需要避免矛盾。和需要消除那些在药典中已经存在相当长时间的、较为完善的标准之间的差异。预见性协调是因为生物技术产品而产生的,回顾性协调则集中在药用辅料和分析测试方法上,而前瞻性协调则反映了需要与当今药物分析技术共同发展的哲理和氛围。

在进行协调时要意识到每部药典都是一个独立体,具有由法律或者条约规定的、在协调过程中必须承认一定的权利和义务。令人感到困难的是,人们正尝试一项与以往任何努力都不相同的、涉及三方药典修订系统的前瞻性工作,而每部药典都拥有导致药典政策差异在不同的文化和历史背景从 30 年至 180 年的成长史。

必须看到协调是一种自愿性的行为,没有法律和条约要求对药典进行协调统一。事实上,没有一个组织机构能够强迫协调。使协调过程复杂化的原因是药典标准首次出版、修订本出版进度、公众关注的程度、更新条款等方面在世界范围内存在着不同的趋势。理想的系统将使每部药典同时或者在接近同一时间内采取统一行动。然而实际情况是在资金、出版和认可程序上都不令人满意。由于没有得到特别的支持,药典的协调工作占用了其他药典项目的资源。

最初征求有关药典协调次序的意见的信函是于 1990 年 5 月由英语版的 USP、英语版和法语版的 EP 和日语版的 JP 联合发布的^[11]。征求意见的对象为每部药典所服务的国家和地区的管理机构和制药行业协会。该信函反映了在 1989 年大会上发言者的观点,主要针对药物辅料提出了三个问题:①哪一些辅料是问题的源头或造成延期的源头?②由于辅料标准的差异,是否有必要重复稳定性试验或者生物利用度研究?③10 种最需要协调的辅料是什么?该信函也要求对上述问题做出反应的读者同时确定那些最需要协调的辅料在药典各论中的质量标准、测试方法和含量测定方法。



制药公司通过其行业协会与各自的管理机构发回了反馈。全部的反馈由 USP 编辑成册,并列出了前 10 种辅料的名单,经过各方药典讨论之后将作为初步协调统一的重点。“领导”的概念(即后来被称作负责协调的药典)得到采纳,处于领导地位的药典将负责对被选出的辅料的各论进行修订。最初被选出的辅料名单包括硬脂酸镁、微晶纤维素、乳糖、淀粉、纤维素衍生物、蔗糖、聚维酮、硬脂酸、磷酸钙和聚乙二醇^[12]。

三方药典都有期刊,质量标准有任何修订或者增订时就会通过期刊向公众公布^[13]。因为任何一方药典都能及时了解三种期刊中与协调有关的文章的内容,所以对标准的修订不会由于另两方的疏忽而不同步进行。制药行业基本上都订阅了这三种期刊,因此也应该完全了解协调的最新动态。制药行业与药典在协调问题上脱节的原因只有可能是由于工作速度与各自法律程序的差异造成的。

由于只涉及两家生产商,预见性协调在处理生物技术产品时表现得非常成功^[14,15]。对于这两家厂商的药品,药典没有理由具有不同的标准。这与以下情形完全相反:某些不再受专利保护的药品拥有多家生产厂商。对药典中约 4000 个原料药和制剂的标准进行协调统一是不可能的。

USP 必须密切关注美国的法律。在美国,我们不能通过“排他标准”使某些人被排除在制药行业以外。另两方药典也相继面临着同样的问题并处在同样的处境,只是不像 USP 那样快速表示避免排外标准的可能性。只有拥有一个有效的医学或者药学理由限制竞争者时,药典才可以制订这样的质量标准。

我们经常听到的一种说法是要“从本质上进行协调”。从本质上进行协调是指根据实际情况尽可能地做到最协调。很有必要对协调的程度按 0%~100% 的尺度进行评定。但正如过去审判的一句老话讲的那样:“你坐的地方就是你站的地方。”USP 的协调尺度采纳了实验室管理者的观点。由于他们负责安排工作、培训、主要物品的采购,因此他们的观点显得非常有实际价值。对于一个具有量值特点的事物,人们必须对差异的显著性做出判断。完全协调统一的检测项目要求使用相同的测定方法和限度。而协调程度略逊的情况是指使用相同的测定方法,但两部药典具有不同的限度,并且一个限度包括了另一个限度。如果一个限度不能包括另一个限度,那么有一定程度的不协调。有关 PDG 名单上的辅料以及美国国家处方集和其他地方收载的 200 个辅料协调的总体情况发表在《药典论坛》上^[16]。

当出现以下情况时,衡量协调程度十分必要:药典每篇各论约含有 10 个检测项目,该各论在被协调时可能会涉及七八个项目甚至是所有 10 个项目。所以,如果 10 个项目中有 8 个得到协调统一的话,那么可以表示为协调了 80% 的各论^[16]。

协调的目的是要使政策、标准品、各论的质量标准、分析方法以及药典接受标准达到一致。我们必须承认不可能总是达成这种一致。当不能达成一致时,协调意味着只

是基于客观相似性上的一致,并且应说明这些差异。因此,我们的目标是和谐而不是统一。

国际药典公开大会

由 BP、EP、JP、USP 共同提议,第一次关于辅料标准协调的国际药典公开大会于 1991 年 1 月 30 日至 2 月 1 日在美国佛罗里达州奥兰多召开,与会者达 165 名,代表了 11 个国家、59 个制药厂商及辅料制造商或供应商、3 个管理机构(FDA、EEC 和 HPB)、7 方药典(英国药典、欧洲药典、日本药典、美国药典、法国药典、意大利药典和西班牙药典)^[17]。为了准备这次会议,USP 召开了关于硬脂酸镁和乳糖的公开会议,参加者来自欧洲几乎每个主要厂家和 USP。

此次大会确定药典的目标是改善和协调现有辅料的标准、把重点放在测试方法上并且在测试方法达成一致之后制订标准,发展包括粒度、表面积和密度测试等在内的功能性检测。

在执行公开大会的决议的过程中,药典协调成员的结构发生了变化。尽管在一开始 BP 是“四方小组”的一个独立成员,鉴于辅料标准和测试方法的协调的执行被认为是 EP 管辖的一件区域性事务,而 BP 的独立身份也因此终止。结果,USP、JP、EP 三方组成了现在的 PDG 并继续其工作。

第二次关于辅料国际协调的联合药典公开大会在 1994 年 1 月于美国佛罗里达州圣彼得堡举行^[18]。此次会议的主要进展就是确定了会议是协调的关键这一原则。在 1991 年 11 月于布鲁塞尔举行的药典协调国际大会上报道了药典协调的进程,并对 PDG 为了完成目标所做的努力给予了高度评价。大会还完成了几项切合实际的、重要的里程碑式的任务。

第一个最重要的里程碑就是 JP 认为有必要建立一个媒介,通过这一媒介可获得公众对药典修订的意见,而且这样的一个媒介对于彼此之间的交流也很重要。正是意识到这种必要性,JP 决定每季度出版《日本药典论坛》(JPF)。第一版 JPF 于 1992 年 1 月出版,其中包括了对硬脂酸镁和乳糖各论进行修订的建议。另外值得一提的是,在 JPF 中与国际协调有关的部分使用英语编写,而与日本国内有关的修订内容用日语编写。

第二个里程碑是在 1992 年 5 月由 PDG 发出的除了辅料之外希望有更多内容得到协调的信函。该调查得到的反馈意见主要集中在测试和含量测定上。对反馈意见加以排序并经进一步分析之后,将最重要的辅料的范围扩大到了 25 个。药典对于协调的确定和排序名单在药典论坛上可以找到^[12,13]。

JP 对药典的协调还采取了另一个措施,即从 1993 年 10 月的 JP Ⅺ 增补本开始,在前后两版药典发行的当中每年出版增补本对日本药典进行更新^[11]。

对药典协调工作的调整目前正在进行(附录 I 列出了

到 1999 年 12 月为止的详细过程)。三方药典系统、九种出版物的修订过程、时间要求和出版时间表不可能与预想完全一致。当发行物到达修订阶段出现未预见到的情况或者与现有系统的内容相悖时,要进行不断的调整。虽然 USP 在 1980 年就辅料问题建立了第一个专家组(关于药物成分的分组委员会),但其他药典并没有成立这样的专门小组,致使进程复杂。

通过对第一批辅料(乳糖和硬脂酸镁)的协调获得的经验表明,由于涉及数量众多的团体和专家,前瞻性协调和回顾性协调都必将经历一个长期的过程。

测定和标准

1. 辅料中的杂质

限度的测试在药典中具有悠久的历史。对于有些项目(如重金属),方法的灵敏度是标准的基础,而 USP-NF 当前的限度是以毒性为基础的。因此,以毒性为基础的标准与以方法为基础的标准在药典协调时发生了分歧。当前以毒性为基础的标准可以避免安全的药品在市场上消失,而从前这种以方法为基础的标准则可能由于技术贸易壁垒陷入排外标准。

2. 与生物技术相关的标准

预见性协调随着第二次生物技术产品标准大会的召开正式执行。共有来自于 20 个国家的约 150 名科学家和管理人员参加了这次会议。由于三方药典的修订专家的积极参与,大会提出了一系列与信息介绍性章节、测试和含量测定通则、经过选择的生物技术生产的人用药和生物制剂各论有关的建议^[14]。

生物技术产品的引入代表了一个决定性的时刻^[15];亦即为避免药典从承担任务到为新工艺产品的药典标准的协调过程中出现的标准之间相互矛盾创造了机会。创造这一机会的另一个原因可能来自于普通的对照品的实用价值。

考虑到医疗条件、临床环境以及对全球化投资即时回收的渴望需要通过全球统一的标准来使复杂的技术简单化并且不产生药义。

USP 和关于药物质量的国际药典协调大会(ICH-Q6)都对生物技术药物很感兴趣。药典标准与开发和管理机构审批生物技术产品之间的关系并不明确。美国药典收录了许多在生物技术产业中被广泛运用的通则(诸如稳定性、注射剂、细菌内毒素等“水平标准”)以及关于生物技术产品的术语介绍和便于交流等信息介绍性章节。

3. 国际药典协调的状况

USP24-NF19 的增补本收录了以这一名称命名的信息介绍性章节,其中包括由 PDG 执行的所有项目。附录 II 中列出了至 2000 年 1 月为止的所有项目并指定了负责协调的药典。然而,这里列出的每个项目的状况并不具有法定性,

因为它随着每个增补本的出版而变化。

由于各方药典的修订计划按照不同的进程进行,当强制性的标准出现分歧时,应比较两国或者多国药典最新的内容,并与法定的药典作比较。

协调的草案并不具有法定的地位。PDG 在 5B 阶段结束工作。协调项目的进展可以并且应该在最新几期刊物《药典论坛》、《日本药典论坛》、*Pharmeuropa* 中查对。对于 USP24-NF19 中生效的标准可以参见最新的增补本或临时修订通告。

4. 等同性

除了 USP24-NF19 增补本中的“国际药典协调的状况”这一章节,〈1196〉以外,通过 PDG 程序制订的 EP 和 JP 中的测试方法和含量测定方法与 USP-NF 具有等同性。由于每国药典的法律地位并不完全相同,在支持某项计划或行动前应进行缜密的核对工作。

等同性的范围包括那些已达到 5B 阶段的药典各论、测试方法和含量测定方法。在三方药典的期刊中会解释发生分歧的本质和原因,只有那些已申明是例外的情况才会被认为是不同等的。

国际协调大会

成立于 1990 年的国际协调大会(ICH)的成员有欧洲、日本和美国的药品制造商协会(分别简称为 EFPIA、JPMA 和 PMA)与欧洲、日本和美国的药品管理机构(分别简称为 EEC、MHW 和 FDA),药品制造协会国际联盟(IFPMA)作为秘书处参加会议。只有三个药品制造协会和三个药品管理机构是 ICH 的成员,而各方药典并不是 ICH 的成员。受邀参加会议的观察员包括加拿大、WHO、欧洲自由贸易协会(EFTA)。

由于拥有药品有效性、安全性和质量方面的专家工作组,ICH 最有机会在世界领先的药品管理机构和制造协会之间进行协调。ICH 的药品质量专家工作组(EWG-Q)负责 Q4 主题“药典”。

药典参与了 ICH 的进程并致力于改善药品研发和注册的国际环境。已出版的标准适用于所有已经在销售的药品。在这种情况下,每家制药公司都有质量控制(QC)部门及其检验的背景。QC 部门往往是制药工业中最保守的元素——这是由他们的职责决定的。当 QC 部门认为药品通过现行的检测方法检验后能够准确地反映药品质量的真实情况时,他们极不愿意改变检验方法。因此,把试图开发协调统一的利于活跃一方的标准应用于世界的制药工业与不扰乱制药市场的秩序之间存在着矛盾。目前在药典方法的协调方面已经取得了重大进展。

1991 年 11 月,两年一度的 ICH 第一届大会在布鲁塞尔召开。会上,美国药典、日本药典和欧洲药典都提交了与药典辅料标准的协调有关的文章^[19],另外还创建了诸如稳定性、方法验证、杂质和生物技术等其他主题。所有这



些主题均涉及各方药典的内容,而对某些主题的协调就是以美国药典的通则作为背景的。

ICH 筹备指导委员会对于 USP 要求成为大会观察员的申请给予积极的响应,他们认为 USP 是执行美国法律、具有法定身份、非政府非行业的组织机构。现在,所有三方药典都参加了 EWG-Q 的活动,在两年一度的 ICH 中属于独立的机构。

稳定性牵涉到药品质量的关键,在药典标准中有多种表现形式,因此,EWG-Q 最先就此专题提出了指导原则。为了与 ICH 倡导的长期试验储存温度保持一致,USP 重新定义了“受控室温”这个概念,代之以“平均动力学温度 25℃”这一术语。在储存标签的表达方式上,ICH 建议取消那些可能与在美国或其他地区的实际操作相冲突的形式。这样,USP 标准和 ICH 指导原则在药品稳定性上达成了共识,USP 的积极参与成就了期望的成果。

对分析方法的验证是新药审批和药典修订中都必须要求的。在药品研究制造商协会、FDA 和美国药典联合就此进行国际协调之前,美国药典已经刊登了一个有关的信息介绍性章节,标题为方法验证概要(1225)。在递交到审核部门的新药资料中,浓缩了分析方法的验证工作,这是 EWG-Q 工作的意义所在。后来,由于使用者的意见,ICH 文件的内容得以扩充,这样与美国药典(1225)的要求更加接近并很好地解决了由于不协调而产生的分歧。修改后的 ICH 文件与美国药典的章节在篇幅和细节上更加统一,以至于有关验证的术语和验证的策略都是一致的。

PDG 建议就光稳定性试验建立一个统一的方法,该建议被 EWG 采纳并由日本负责起草指导原则的初稿。一个统一的方法就这样诞生了,而这仍是为了新药报批。

杂质有很多种类,因而进行协调的文本很多。每个人都认为应该把毒性杂质控制在极低的水平内,但检测的困难限制了选择。一旦分析目标明确之后,协调统一的方法即可立即开展。USP 和 ICH 都把需要对杂质进行检测的含量阈值定为等于或大于 0.1%,这对化学原料药的日常商贸具有非常重要的实际意义。另外,ICH 指导原则参考了药典对有毒杂质的限量规定,如重金属。这样,在所有关键点上,ICH 对化学新药的指导原则与已建立的、适用于数以百计的已上市药物的 USP 对杂质的规定之间不再存在矛盾。USP 把那些在原料药纯化或降解中具有明确信息的杂质称作信号杂质,剩下的杂质被称作非特异性普通杂质,并标记非特异性普通杂质的要求并制订了 2% 的总量限制。ICH 没有设置这样的上限。不要求公开专利药合成或纯化方法的详细信息,他们已完成限制副反应的必要任务,从而保证测定结果是有意义的。但 ICH 指导原则要求鉴定每个杂质和确定每个杂质的限度并逐批详细记录所有的杂质。考虑到毒性,杂质的量凡是超过 0.1% 就应对其“定性”;USP 要求被告知任何已知毒性杂质的信息。

USP 对有机挥发性杂质有限度的要求已经有多年历史了。当 EP 采取类似的要求时,大洋两岸的毒理学家对于每种溶剂应采用什么合适的限度问题有不同的结论。应各药

典的要求,EWG-Q 接受了这个议题。经过努力,溶剂残留的指导原则终于成功出台了。与现有的 USP 限度相比,有必要把某些限度向上调整或者向下调整,但都不是大幅度的修改。协调从开始至结束整整经过了 15 年的努力,如今,只有苯这个溶剂的问题还没有得到解决。

1. 质量标准文件

ICH-EWG-Q 起草了 Q6A 和 Q6B 两个指导方针,内容涉及新药的质量标准,用来指导新药的注册。Q6B 收录了与生物技术有关的质量标准内容,Q6A 收录了以前属于 EWG-Q 指导原则范围的所有其他药物的质量标准。药典方法是这两个指导原则的本质所在。

ICH-EWG-Q 共发表了 12 个通则(测试方法和含量测定方法),这些通则对于新药的注册相当重要,并督促 PDG 致力于迅速协调统一(参见附录 III)。其中之一“抗菌防腐剂效力”因为在使用相同的微生物方法时在不同的药典间具有本质上的差异,这种明显的不协调终于导致这一协调工作在 1999 年被放弃了。在剩下的 11 个章节中,除了两个章节(“非灭菌药品的微生物限度”和“剂量的均匀性”)之外,其余章节在 1999 年底之前在科学的内容上都得到协调统一,只是出版工作还未完成。

Q6A 和 Q6B 文件是在关于质量标准的北美会议召开之后产生的。诸如方法的选择、应用范围或者总体原则(溶出度、杂质、微粒等)等内容都与覆盖范围广泛地位显著的 USP 一致。主要的分歧过去是、现在仍然是制剂处方中活性成分的比例导致选择进行含量测定抑或是称重来建立剂量均匀度。

2. 同等性

将来,有可能通过修改实验数据以加快协调而不是通过协调一个统一的文本、一般测试方法或者含量测定方法来建立一个药物的某个属性(例如,以滴定法测定水分和以干燥失重法测定水分)。当然,这是以等同性的方法在已认可药物的各论中的鉴别、效价、定性、纯度、生物利用度或者标签等方面能够提供可供比较的数据为前提的。如果对结果有争议,只有在按照合适的药典上记载的方法得到数据才能得出结论。

这种同等性建立在药品的生产和控制处于良好生产实践的假想下,而在当今国际环境下,这种假想是完全合理的。

同等性方法并不一定要求使用相同的试剂、步骤或者测定手段。药典的法定方法本身并不需要验证,但是,当法定方法应用于一个具体的制剂(处方)时,应该验证其适用性(如是否存在干扰组分)。

同等性可以减少重复性检验以及在各药品注册或审批上耽误。从而促进合法药品在国际的商业流通。USP 凡例的每一项条款都不能废除,但根据同等性原则,对替代方法的宽容也不可按各项的引证而予取消。

就像 USP 通则中提到的那样,当某个药品被美国药

典-国家处方集作为各论收载时就意味着该药品得到了它的承认。每个各论都包含着许多标准来详细说明这个为大家所接受的药品,并且规定了一般测试、含量测定方法和其他指标用以表明该药品是可以被接受的。各论及其解释为凡例和通则中的主题。在一个各论中,一般测试方法和含量测定方法是互相关联的,因而有可能要进一步声明有别于通则或凡例必要的变化。也就是说,药典各论阐述了相互依赖的属性,新出现的各论的要求和凡例,必须作整体考虑。因此,只有对同一样品重复测定以及两种方法均经过验证取得最初的核实后,等同性方法才能有效采用。

附录 I: PDG 的工作程序

1. 第 1 阶段: 确定

PDG 先确定需要协调的主题,然后对每个主题安排某一药典负责协调。

2. 第 2 阶段: 调研

针对需要协调的主题收集以下三方面资料:三方药典中的质量标准、在市场上的等级、潜在的分析方法。对于新药或新方法学,应收集和分析科学文献中的或者来自制造商的现有资料。然后,为负责协调的药典准备一份各论或者章节的初稿和一份包含起草说明建议合理的报告,必要时可提供合适和现成的验证数据。这份在本过程中被称为第 3 阶段草案的草稿的诞生标志着第 2 阶段的结束。第 3 阶段草案连同解释选择每一种分析方法或者限度的理由以及支持这些理由的说明和数据,由对其负责的药典秘书处提交给另外两方药典的秘书处。

3. 第 3 阶段: 建议

三方药典在他们下一期的论坛期刊上以负责协调的药典方的文本格式发表第 3 阶段草案。必要时,当因为特殊问题需要征求论坛读者的意见、信息或者数据,还可以向他们提出问题。在 *Pharmeuropa* 和《日本药典论坛》上,第 3 阶段草案属于“国际协调”这一章节。在《药典论坛(USP)》上,第 3 阶段草案收录在“药典预览”这一章节。所有草案均以全文形式公布。为了更好地理解文中的内容,相应的秘书处不得不添加一些相关资料,例如增加对于现有药典中没有收载的分析方法或者试剂的描述。对读者的初步调查所得到的反馈内容最好在草案公布的 4 个月内提交至相应的药典秘书处。公众的评论期不应超过 6 个月。每部药典对反馈内容加以分析,并将整理好的意见在公众总结/评论期后的 2 个月内发往负责协调的药典处。负责协调的药典对收到的意见进行总结,然后准备一份协调文件(第 4 阶段草案)和一份注释,注释中包括对所收到关于前一文本意见的概述讨论以及采取有关应对措施的理由。第 4 阶段草案和注释一起被提交至其他药典的秘书处(第 3 阶

段结束)。

4. 第 4 阶段: 官方调查

第 4 阶段草案在各方药典论坛上以各自惯用的药典格式发表。在 *Pharmeuropa* 和《日本药典论坛》中,第 4 阶段草案与注释一起属于“国际协调”这一章节,在《药典论坛(USP)》中则收录在“正在进行的修订”这一章节。论坛的读者对该草案的意见最好在 4 个月内完成,最迟应在发表之后的 6 个月内被提交至各自的药典秘书处。每部药典对收到的意见进行分析,然后把整理好的意见在公众总结/评论期之后的 2 个月内发往负责协调的药典处。负责协调的药典对收到的意见进行总结,然后起草一份协调统一文件(阶段 5A 草案)和一份注释,注释中包括对所收到关于前一文本意见的概述讨论以及采取有关应对措施的理由。阶段 5A 草案和注释一起被提交至其他两个 PDG 成员秘书处(第 4 阶段结束)。

5. 第 5 阶段: 一致同意

(1) 临时文稿。另外两部药典在收到阶段 5A 草案后应于 4 个月内进行分析讨论。三方药典要在本阶段内努力达成一致的意见,然后再启动阶段 5B。在极少数情况下,可能会出现没有达成完全一致意见的情况,或者三方中任何一方发现有新的未预料的严重议题需要讨论。根据议题的重要性和复杂性,可能会采取多个解决方案,其中之一就是由负责协调的药典召集三方药典的专家进行讨论以寻求完全一致。该讨论小组将起草一份 5A 文件的修改稿(5A-2),并将其发表在三方药典的论坛上征求公众的意见。最后由该小组专家对意见加以归纳总结,起草一份一致同意的文件(5B)。

(2) 定稿。当一致同意后,阶段 5B 草案(一致同意文件)由负责协调的药典提交至其他药典签署。

注:在最后两个阶段,各方药典对“协调统一后的”章节和各论的执行是根据各药典组织建立的程序单独完成的。

6. 第 6 阶段: 采纳

协调统一的文件为被采纳提交至各方药典的主管机构。各方药典根据各自的程序接纳协调后的文稿。如果发生了与某一药典所在地域的一般性政策不符的情况,必要时可对阶段 5B 草案做一些适当的修改而于采纳。因此,药典各论的协调并不意味着在每一方面都完全一致。采纳的标准将在药典增补本或如果可行则在新版/修订版药典上发表。如果在阶段 5A 未达到完全一致,三方药典将一起准备一篇关于分歧内容的文章并且在各自的论坛上发表。

7. 第 7 阶段: 执行日期

三方药典将互相通知在特定区域内执行标准的日期。

附录Ⅱ：辅料的协调

辅料	负责协调的药典
乙醇	EP
苯甲基乙醇	EP
脱水乙醇	EP
乙二胺四乙酸钙二钠	JP
磷酸氢二钙	JP
无水磷酸氢二钙	JP
羧甲基纤维素钙	USP
羧甲基纤维素钠	USP
羧甲基纤维素钠（交链）	USP
微晶纤维素	USP
粉末纤维素	USP
醋酸纤维素	USP
醋酸纤维素邻苯二甲酸盐	USP
无水枸橼酸	EP
枸橼酸—水合物	EP
交链聚维酮	EP
乙基纤维素	EP
羟乙基纤维素	EP
羟丙基纤维素	USP
羟丙基纤维素（低取代）	USP
羟丙基甲基纤维素	JP
羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸盐	USP
无水乳糖	USP
乳糖—水合物	USP
硬脂酸镁	USP
甲基纤维素	JP
甲基对羟基苯甲酸	EP
凡士林	USP
白凡士林	USP
聚乙二醇	USP
聚山梨酯-80	EP
聚维酮	JP
糖精钙 ¹⁾	USP
糖精（游离）	USP
糖精钠	USP
二氧化硅	JP
胶质二氧化硅	JP
氯化钠	EP
羟基乙酸淀粉钠	USP
淀粉（玉米）	USP
淀粉（马铃薯）	EP
淀粉（大米）	EP
淀粉（小麦）	EP
硬脂酸	EP
蔗糖	EP
滑石粉	EP
二氧化钛	JP
乙基对羟基苯甲酸	EP
丙基对羟基苯甲酸	EP
丁基对羟基苯甲酸	EP
甘油	USP

1) 日本药典不赞成协调，所以 USP 和 UP 将进行双边协调。

注：PDG 确认各国政府制订的各种饮用水标准将不进行协调。

参见纯化水各论。

附录Ⅲ 一般测试和含量测定方法的状况

测定项目	负责协调的药典	ICH—Q6 列出项
溶出度 ¹⁾	EP/USP	*
崩解度	EP/USP	*
剂量均匀度 ²⁾	JP/USP	*
颜色和澄明度	EP	*
增加装量	EP	*
重金属	USP	*
不溶性微粒	EP	*
灼烧残渣——硫酸化灰分	JP	*
无菌	EP	*
细菌内毒素	JP	*
微生物污染	EP	*
防腐剂效力 ³⁾	EP	*
筛分法测定的颗粒分布	USP	*
吸入量	EP	
原料药密度和敲实密度	EP	
光学显微镜方法——粉末	USP	
化程度	USP	
粉末流动性	EP	
比表面积	USP	
片剂脆碎度		

1) 仪器 1、2 和 4 已经统一。并非所有的仪器都收载在其他药典上。判定尺度已经统一。溶出介质的选择方法没有统一，因为人种和处方的差异，可能不存在合理的主题。

2) 包括含量均匀度和质（装）量差异。

3) 由于美国和欧洲在本质上使用不同模式方法，在测定次数和结果判断上无法协调。

参考文献

1. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. The United States Pharmacopeia; 3rd rev., Lippincott, Grambo and Co.; Philadelphia, 1851.
2. Proceedings of the First International Conference on Harmonization. D'Arcy, P. F., Harron, D. W. G., Eds.; Queen's University of Belfast; 1992; 135—182.
3. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. Abstract of the Proceedings of the National Convention of 1910 for Revising the Pharmacopeia; Washington, D. C., 1910.
4. The U. S. Pharmacopeial Convention, Inc. Abstract of the Proceedings of the United States Pharmacopeial Convention of 1930; Washington, D. C., 1931.
5. Anderson, L. Unpublished manuscript. USP history; 1906—1929; 55—56.

6. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. Abstract of the Proceedings of the Decennial Meeting, The United States Pharmacopeial Convention 1940; Washington, D. C., 1941.
7. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. Abstract of the Proceedings of the Decennial Meeting, The United States Pharmacopeial Convention 1960; Washington, D. C. 1961.
8. The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Proceedings of the USP Open Conference of Revision Issues. Rockville, MD, 1989.
9. Proceedings of the 20th Anniversary of the European Pharmacopoeia. Pharmeuropa 1990, 2 (1), 266—268.
10. PMA of Tokyo and Osaka, Conference on International Harmonization of Pharmaceutical Quality-Vision of Pharmacopoeia in the 21st Century. PMA; Tokyo, 1990.
11. Society for the Japanese Pharmacopoeia. Jap. Pharmacop. Forum 1992, 1 (1), 20—29.
12. Pharmacop. Forum 1993, 19 (4), 5849.
13. Pharmeuropa 1993, 5 (2), 65.
14. Proceedings of Interpharmacopeial Open Conference on Standards for Biotechnology-Derived Products, Pharmeuropa, 1993 Special Edition
15. Dabbah, R.; Grady, L. T. Curr. Opin. Biotechnol. 1998, 9, 307—311.
16. Cecil, T. L.; Paul, W. L.; Grady, L. T. Update of the Degree of Harmonization Survey of Excipient Monographs. Pharmacop. Forum 1997, 23 (2), 3895—3902.
17. The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Proceedings of the Joint Pharmacopeial Open Conference on International Harmonization of Excipient Standards. First Conference; Rockville, MD, 1991.
18. Ibid 1994, Second Conference.
19. Proceedings of The First International Conference on Harmonization, Brussels, 1991.
20. Proceedings of The Second International Conference on Harmonization, Orlando, FL, 1993.
21. Proceedings of The Third International Conference on Harmonization, Yokohama, 1995.
22. Proceedings of The Fourth International Conference on Harmonization, Brussels, 1997.

(乐 健 译)

药典标准：欧洲药典

Agnes Artiges

European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France



引言

药典尤其是欧洲药典的目的是提供共同的标准来促进公共卫生事业，这些标准是由卫生权威人士以及所有涉及药物质量控制的人们认可的。这些标准使药物具备适合的质量，是患者和消费者安全使用药品的的基础。这些标准的存在促进了医药产品在欧洲的自由运转，并确保从欧洲出口的医药产品的质量。

如以前所述^[1]，欧洲药典的地位是建立在欧洲委员会支持下产生的国际协定的存在基础上的^[2]。欧洲药典的基本特征和目标在这个协定中有所描述，下面的章节讲述了医药质量控制领域的发展过程，以满足欧洲和国际管理权威人士和工业界协调工作的需求。

第三版及其特点

欧洲药典不仅对多年来知名的药物起重要作用，也对新药起以下作用：

- (1) 建立了不同来源物质的统一标准规范；
- (2) 出版经过验证的方法；
- (3) 提供共同的参照物质；
- (4) 建立清晰的各论（杂质的控制在各论中有专门的描述）；
- (5) 给使用者和其他组织提供了一个论坛。

第三版在 1996 年出版，每年一次的增补本在年中出版（在 1997 年出版 1998 增补本，在 1998 年出版 1999 增补本，在 1999 年出版 2000 增补本）。现在所有欧洲药典的新版本标题包括其内容和被执行的年份，这应该使它们变得更容易使用。每本增补本都是累积的，并且替换以前的内容，包括大约平均 100 篇新的各论和 150 多篇修订文稿。

印刷版本和电子版本都有出版，是通过欧洲委员会底下的欧洲药物质量指导会（EDQM）出版的^[3]。

1. 内容

第三版包括一个介绍性的章节（凡例），一个关于一般的方法、正文和试剂的章节，接着是以字母顺序排列的各论，内容是关于在药品（包括辅料^[4]和草药^[5]）制剂中使用到的所有类型的物质。一些关于制剂的各论，如放射性药品、疫苗和一些激素制剂（如胰岛素）也包括在内。也有一个各论是关于同种疗法（homeopathic）的制剂的。

该书的最后一个章节重点是对剂型的一般各论。

我们在这里主要评论各论的类型。

1.1 凡例

介绍性的章节概括了欧洲药典的法律特征，并给出了主要的定义。它解释了药典每一部分的法律意义，并指出了各论中每部分的作用。当必须参考欧洲药典的一个各论时，这个章节是必读的。

1.2 关于化合物的各论

所有的这种各论都以相同的格式出版，其在“欧洲药典各论叙述的技术指南”中有所描述^[6]。这个指南包含了与共同体方针中一样定义的概念，这个共同体方针经过国际协调会议（ICH）包含了在国际水平上共同采用的指导方针。因此，两个关于药典使用的分析验证的指导方针被整合入这个技术指导中，并且甚至通过主要分析方法（如分光光度法和液相色谱法等）的特殊章节来补充。

ICH 关于杂质的指导方针也整合入技术指南中，而关于溶剂残留的指导方针则整合入欧洲药典的一般性章节之中。

关于化学物质的欧洲药典各论已经有所修改。由于不同的厂家有不同的合成方法，各论的修改也正是为了更好地控制这些变化产生的杂质的轮廓范围。现在每个修订过的或新的各论在其末尾处都含有一个杂质的小节，列出了各论中的方法可以检测到的杂质。遇有需要该节分为两部分：质量控制的杂质列表；各论可分析检测出杂质的列表。但这些杂质在 ICH 指南中并不要求。杂质的列表包括化学物质的命名和分子式，使该小节更容易使用。

除此之外，现在各论还建立了一个各论适宜性证书程序的附录（参见后文），这样就完全符合人类使用的药物 75/318/EEC 指南^[7]、兽药的 81/852/EEC 指南^[8]、EU 指南的注释和“该档案第二部分中活性物质的要求摘要”^[9]的要求。

最后，这些各论的鉴定小节也已经修改，目的是为了阐明给出替代鉴别试验的各论。该小节的地位在凡例中已得到了确定。它们规定当有两个鉴别方法组时，第一个方法组应是较完整的方法，生产活性物质的厂家应完全按照这个方法组操作；第二个方法组是属于替代方法，较不复杂，使用户可溯源到用于需要产品的厂商（其按照第一个方法组所有的方法操作）。

1.3 关于生物物质的各论

所有的生物药物，如激素类^[10]、人类使用的疫苗^[11~13]、兽医使用的疫苗^[14]和血制品^[15]，都在特殊物质各论中。

在这种类型的各论中改变了一些重要的概念，目的是

为了符合共同体的许可证要求和跟上这一领域的发展。下列的变化值得特别的注意:

- (1) 生产部分的介绍;
- (2) 如果可能,更新与实验室动物的使用有关的试验;
- (3) 取消反常的毒性试验和换以毒素试验(LAL)。

生产部分的作用在凡例中叙述。这一部分的要求主要适用于具有可疑物质的厂商和检查员,其负责检查样品是否符合欧洲药典,或者检查是否符合许可证中提到的内容。

在这一部分中描述的方法对于成品不一定要像鉴别、检查和含量测定中的方法那样要由外部的分析员进行分析。然而,它们对于可疑物质的质量保证具有重要的作用。

近几年来,欧洲药典委员会制定了一个关于更换药物质量控制试验中动物的使用政策,它与欧洲委员会相应协定的要求一致。并建立了一个相当大的“3R”(精炼、减少、更换)程序。由此,以EDQM为代表的欧洲委员会和欧洲共同体委员会,现在正致力于一个广泛标准化的程序^[16]以建立如下的合作研究:

- (1) 评估、发展、改善生物制品试验方法的标准化;
- (2) 制备欧洲工作标准;
- (3) 应用“3R”概念替换实验室动物的使用;
- (4) 继续欧洲生物制品试验方法的协调,如果可能,与WHO合作。

这些合作研究已促使了欧洲工作标准的建立。结果,生物产品的测定度和潜能的表达可对应于相同的参考标准。全欧洲认可的参考标准使国家控制机构和厂商能够避免第二标准的高成本重复工作,否则会导致不一致。

合作研究还把目标定在了替代参考方法的验证。各种分析或者操作步骤的比较试验可以用来验证所选择的方法,或甚至在与下述有关的方法中建立紧密的相关性,即动物试验法、体外生物方法和以物理化学分析为基础的方法,这样便于将来方法彼此更换。为了使合作者之间更容易交流和理解,合作研究的结果在 *Pharmeuropa* 特别议题中出版^[17]。

1.4 关于剂型的各论

有一个新章节是用来合并介绍与剂型有关的所有各论,在有必要的地方,该各论已通过技术试验来补充内容,并加以协调,这样,该章节组成互相紧密联系的整体。

应该注意到该章节和以前在1991年出版的EEC指导方针“剂型的规定术语、管理和包装指南”应欧洲共同体委员会的要求通过欧洲药典委员会一起修订。

因此,两项任务同时进行:一方面,修订欧洲药典的所有各论;另一方面,修订关于规定术语方面共同体指南。

这个指导方针已经被一个在欧洲药典中称为“标准术语”的修订本替代^[18];它已经被翻译为共同体里的所有语言。事实上,不但该文件以共同体的各种语言来叙述术语,而且它还包括几个不是欧盟成员的欧洲药典代表团的国家的语言表达的术语,这是因为他们希望翻译成他们的语言。因此,修订的文件将会以21种欧洲的语言列出术语(保加

利亚语、克罗地亚语、捷克语、丹麦语、荷兰语、英语、芬兰语、法语、德语、希腊语、匈牙利语、冰岛语、挪威语、意大利语、波兰语、葡萄牙语、斯洛伐克语、斯洛文尼亚语、西班牙语、瑞典语和土耳其语)。

这个相对较大的文件,包含了人类用药和兽药,作为药典的特刊出版。第一版出版于1996年11月,然后每年都修订;第二版修订本于2000年2月出版。这将产生协调一致的全欧洲都能使用的版本。这些术语对于应用具有强制性,并概括了欧盟核心成员国和非核心成员国批准的产品特征。

如果提供正当的理由,该列表可应要求加以扩充。已经建立起一个特殊程序^[18]。剂型可在EDQM网站上看到。

1.5 关于生产方法的一般各论

另外一种表述各论质量的是应用20世纪80年代和90年代内发展起来的观念,它是一种不能只通过成品试验来控制产品质量的一个概念。只是寻求的目标一直在被控之中,一个产品的质量应包括产品的产生及其以后的整个生产过程。

为了避免政策关键点的重复,欧洲药典委员会目前的方案是准备了一般性的各论,应涵盖所有的各论,但对于欧洲药典中没有各论的物质也能够查阅。这样,就准备好了关于生产方法新的一般性各论,例如,“发酵产品”^[19]、“rDNA技术产品”^[20]、“具有传播海绵状脑病(transmitting spongiform encephalopathy, TSE)危险性的产品”^[21]的各论。

除此之外,欧洲药典编译器已被要求对特殊物质的各论增加生产方面的内容。生产部分内容给出了关键的内容,但不是所有的细节,细节部分可向厂商查阅。特定的各论中除了生产部分之外,也提到了符合新的ICH指导方针的一般概念。这些细节由每个厂商在适宜性证书的申请中叙述(参见上文)。

2. 各论的修订

欧洲药典委员会很注重更新药典的内容。如果药典主管当局或者许可证主管当局要求修改,修订可以在任何时候进行。欧洲药典委员会针对下列情况,已经定义了各论的修订标准:当:

- (1) 质量差的产品出现在市场上;
- (2) 要求制定与证明操作程序有关的内容;
- (3) 有公共健康的危险(未质控的杂质、弄虚作假的危险等);
- (4) 不再适合的分析方法;
- (5) 在各论不再应用的试验;
- (6) 试剂不能得到;
- (7) 专利接近有效期。

除此之外,一个对应于方法新进展的更大修订计划每5年进行一次。这种修订考虑到了来自于许可证主管当局的新的指导方针,也考虑到了物质成员内部协调的需要。

3. 如何和由谁来制定正文

欧洲药典的制定是由一个委员会执行的，该委员会由国家代表团的主管当局组成，并具有决定权，但要求该代表团的成员应一致投票通过^[2]（今天，27 个欧洲国家^①，包括所有的欧盟成员和欧盟委员会本身，已经签署了该公约。还有其他九个欧洲国家^②和八个非欧洲的国家，他们属于观察者）。

各论由专家组制定，这些专家由欧洲药典委员会按照各国代表的建议任命产生。参与这项工作的专家来自于工业领域、大学和国家控制实验室。

欧洲药典已经逐渐地替代了各国的药典。然而，我们需要强调国家药典秘书处建立在统一欧洲工作中的作用。事实上，他们是识别国家需要和进行组织的最好部门：

（1）与他们领域内的制药、化学和生物工业部门进行协商（整理过的评论被送到欧洲药典秘书处）；

（2）与其他有关的政府组织进行协商（如工业部或农业部）；

（3）与其他与医药相关的部门进行协商，（如许可证主管当局、国家控制实验室和检查部门）。

最后，国家秘书在提供国家级信息方面扮演了重要角色，这些信息包括欧洲规则如何制定和任何国家的正文准备和修订都符合欧洲药典。

在最终采纳之前，所有的正文和各论都在 *Pharmeuropa* 上出版 4 个月以征求公众意见。对于欧洲的国家，评论应该由国家秘书传达；对于非欧洲的公司，评论应该直接送到 EDQM-欧洲委员会（法国 Cedex 斯特拉斯堡 F-67029, B. P. 907）。

Pharmeuropa 是使用者的论坛，属于季刊，其准备和出版都由 EDQM 进行。

4. 成员国的执行

欧洲药典是一种超国家的文件，其取代了签字成员国家的药典。对每个增补本/正式版本（或迅速修订的个别文本）的共同执行日期的采纳是由欧洲药典委员会决定的，这些增补本/正式版本是由欧洲/公共卫生委员会的决议执行的。

虽然签约成员国受到由欧洲委员会出版的欧洲药典的规定和正文的约束，但他们可根据他们的技术、法律和管理法规来执行。因此，在不同的国家使用了不同的步骤。

多数成员直接执行欧洲委员会出版的内容，而其他成员则继续发行他们的国家药典，其与欧洲药典的内容进行全部协调或者部分协调，如果有必要则翻译为他们国家的语言或者体例格式（奥地利、保加利亚、捷克、德国、希

腊、匈牙利、葡萄牙、西班牙、瑞士、英国）。在所有的情况下，如果有疑问时，只有欧洲的药典具有执行权和法律约束力，而不是任何的翻译版本。

各论的适宜性证书

欧洲药典的没有前例程序的适宜性证书（certification of suitability）在几年前就已建立起来^[22]。为什么？几个世纪以来，药典被设计成一种参考物并自认是完好和负责的。然而，在 20 世纪，随着世界贸易的发展，欧盟授权当局发现他们要求厂商在他们的许可申请中提供产品合成的具体内容，以证明该产品通过欧洲药典的各论并能够得到合适地控制。这样，很明显，为避免重复工作绝对有必要重新考虑，这个基本信息如何能被那些需要它的药典编辑者和授权当局获得。

为了解决这个问题，有必要不仅采纳新需要的各论内容，而且要建立一种适宜性证书程序，其在授权和该领域的药典之间将会建立起联系。

如上所述，各论的内容中与生产和杂质有关的部分要经过补充，以使这些各论更加完整和清楚^[23]。

证明程序是一个在欧洲药典中描述的公开标准和需要准备注册的文件之间的补充和桥梁。该程序是一种许多次的共同讨论和合作者之间协议的结果。实际上它不仅是用来估测它与欧洲管理当局一起的协作性，这样他们可全部地依靠它和无保留地认可它的有效性，而且也用来估测与工业界一起的协作性，这样他们能够绝对地相信工业所有权的保护。

基于在各论的制定中收集的数据和某一厂商提供某种物质的数据，适宜性证书证明了这两种类型的数据都可能得出这样一种结论：该物质的质量符合欧洲药典各论中定义的质量。

原则上，对任何物质（活性物质和辅料）都可被许可有一个证明书，例如，有机物质或者无机物质、间接基因经发酵产生的产品、具有 TSE 风险的产品，其在欧洲药典中单独以一篇各论出版。然而，生物物质被排除在外，如蛋白质、从人类组织获得的产品、疫苗、血制品、制剂。

该证书有效期为 5 年，当各论的规定不能完全控制物质的纯度时（如残留溶剂的控制、特殊杂质等）可以包含额外的规定（方法和限度）。

该程序在决议 AP - CSP (99) 4 中有描述，与要提交的文件内容一起^[24]叙述。这个程序列出了允许的证明书（到 2000 年 1 月底有 420 篇），还列出了审核员，这些都在 *Pharmeuropa* 上和 EDQM 的网页（<http://www.pheur.org>）上定期公布，并可直接与 cert@pheur.org 联系。

① 奥地利，比利时，波斯尼亚和黑塞哥维那，克罗地亚，塞浦路斯，捷克共和国，丹麦，芬兰，法国，马其顿共和国，德国，希腊，匈牙利，冰岛，爱尔兰，意大利，卢森堡，荷兰，挪威，葡萄牙，斯洛伐克，斯洛文尼亚，西班牙，瑞典，瑞士，土耳其，英国。

② 阿尔巴尼亚，保加利亚，爱沙尼亚，拉脱维亚，立陶宛，马耳他，波兰，罗马尼亚，乌克兰。



适宜性证书与欧洲药物主文件

虽然两个程序都有相同的目标和要求相同内容的档案,证书程序特别设计来包含欧洲药典中具有各论的物质,而欧洲药物主文件(drug master file)程序的目标是针对于欧洲药典中没有各论的物质。

总之,不仅在原材料厂商和药品厂商(成品)准备许可的档案时,而且在授权主管当局和药典主管当局审核这些档案时,程序使避免重复工作成为可能。在各欧洲授权当局和符合欧洲药典各论情况的审核中也避免了各种差异,并且促进更清晰的交流。最后,该程序允许欧洲药典各论经常更新,以跟上世界市场上的新发展。

对于第四版

欧洲药典主管当局已决定出版第四版。为此,已修订了技术指南和文体指南,而且更多的各论已经或者将被制定。

1. 技术指南

这个技术指南^[6]的对象是参与欧洲药典各论撰写的专家。它制定了需要遵守的一般规则。该文件规定了技术选择的哲学观,这些技术是指物质鉴别试验、杂质限量的测定及其检测方法。

第二版的修订特别是为了符合 ICH 的指导方针。第三版出版于 2000 年 2 月。

2. 文体指南

这是一个对于欧洲药典专业人员和秘书的内部指南,使秘书制定出更一致的文体格式,以英语或者法语这两种欧洲委员会的官方语言出版。目标是为了为起草的方式提供更清晰、明确的内容。这个文体格式,将在第四版中出现,比第三版更简洁。

3. 一般各论

欧洲药典的基本目标是促进药品标准在成员国中的协调。也由于此,欧洲药典委员会认为扩展一般各论的范围是值得并且可能的,其目的是为了通过主管当局来鼓励方法的集中,这样避免了将来协调的困难。

欧洲药典含有许多一般性的各论,其包括下述定义的种类:

- (1) 药品的介绍(剂型各论,如“片剂”、“眼药水”等);
- (2) 产品的本性(放射性药物制剂、人类使用的疫苗等);
- (3) 生产方法(发酵产品、rDNA 技术产品、具 TSE 风险的产品)。

关于药用物质(活性物质或者辅料)的新的一般性各论^[25]已经包含在欧洲药典的 ICH 残留溶剂指导方针和 ICH

新杂质限度中,而没有修订每个单独的相关各论。另外,这些各论用来简化药典的要求,包括无菌、细菌内毒素、在各论中提到的热原测定。然而,由于它是委员会用来适当增加这些要求的政策,所以一般的规定将替代各个各论中的规定。

而且,这个各论给出了术语“活性物质”和“辅料”的定义,解释了委员会关于多晶型体、特殊级别的活性物质、添加/不添加辅料的活性物质的工艺、在各论中可能会有的两套鉴别试验等有关的政策。

这些一般性各论的地位将在章节“凡例”中确定。

4. 与 USP 和 JP 的国际协调

如果没有提到自从 1990 年以来在欧洲、日本和美国药典之间发展起来的紧密联系,该综述就没有写完。他们创建了药典讨论小组(Pharmacopoeial Discussion Group),在世界范围内坚持不懈地进行协调和参与 ICH 计划^[26~28]。这个药典讨论小组在欧洲、日本和美国定期开会(一年两次)。大约 50 篇关于辅料的各论和 20 篇一般分析方法,由国家制药协会提议,被选来在这三种药典中收载并协调。

欧洲药典的一个特别章节关注季刊 *Pharmeuropa* 的动态。由 5 种药典组织的联合公开会议地点有:意大利的维罗纳(在 1993 年 4 月,关于生物技术方面);美国佛罗里达的圣·彼得堡(1994 年,关于辅料方面);西班牙的巴塞罗那(在 1996 年,关于微生物测定);西班牙的塞维利亚(在 1998 年,关于剂型的药物技术试验方面);在法国的斯特拉斯堡(在 1999 年,关于生物制品新趋势),这种会议定期召开,为全世界的专家提供了一个一起讨论的平台。

参考文献

1. Artiges, A. Pharmacopoeial Standards; European Pharmacopoeia. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 1st Ed.; Swarbrick, J., Boylan, J., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1995; 12, 53-71.
2. Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia. European Treaty; Series No. 50, Council of Europe; Strasbourg, France.
3. European Pharmacopoeia, 3rd Ed., Council of Europe; Strasbourg, France.
4. Artiges, A. Excipients: Aspects Réglementaires. *Thérapie* 1999, 54, 15-19.
5. Artiges, A. Pharmacopoeial Standards for Herbal Medicinal Products in Europe, Proceedings of the 5th ESCOP International Symposium.
6. Technical Guide for the Elaboration of Monographs, 3rd Ed.; Council of Europe; Strasbourg, France, December 1999; *Pharmeuropa* Special Issue.
7. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, 5, Council Directive 75/318/EEC, Amended.

8. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, 5, Council Directive 81/852/EEC, Amended.
9. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, Guidelines on Medicinal Products for Human Use, 3.
10. Charton, E. Hormones; The Role of the European Pharmacopoeia. Alternatives to Animals in the Development and Control of Biological Products for Human and Veterinary Use. Dev. Biol. Standardisation (Basel, Karger) 1999, 101, 159—167.
11. Castle, P. Policy and Progress of the European Pharmacopoeia in the Use of Alternatives of Animal Testing in Vaccine Production and Quality Control. Alternatives to Animal Testing in the Production and Quality Control of Vaccines: Present Practice and Prospectives; RIVM; Bilthoven, 1992; 41—52.
12. Castle, P. Alternatives to Animal Testing: Achievements and Recent Developments in the European Pharmacopoeia. Development in Biological Standardization; PEI; Langen, 1994; 86, 21—29.
13. Castle, P. The European Pharmacopoeia and Humane End Points, International Conference on the Use of Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research, Zeist, NL, November, 23—25, 1998; 86.
14. Artiges, A. The Role of Pharmacopoeias. Veterinary Vaccinology; Part. 9, Pastoret, et al. Eds.; 708—711.
15. Artiges, A. Quality and Safety of Plasma Products: Control Authority Batch Release Within the Countries of the European Union and Economic Area, Proceedings of EPFA-EAPPI, 5th Annual European Regulatory Affairs Symposium, Vienna, Austria, September, 29—30, 1998, 108—110.
16. The Biological Standardisation Programme. Pharmeuropa Bio; Council of Europe; Strasbourg France, July 1996; Special Issue 96—1.
17. Pharmeuropa Bio Council of Europe; Strasbourg, France, Special Issues 96-1, 96. 2; Special Issues 97-1, 97. 2; Special Issue 98. 1; Special Issues 99-1, 99. 2.
18. Standard Terms; Pharmaceutical Dosage Forms, Routes of Administration, Containers. Pharmeuropa; Council of Europe; Strasbourg, France, January 2000; Special Issue.
19. European Pharmacopoeia, 3rd Ed.; Monograph No. 1468, 1111—1112, Supplement 2000.
20. European Pharmacopoeia, 3rd Ed.; Monograph No. 0784, 1435—1438.
21. European Pharmacopoeia, 3rd Ed.; Rapid Implementation Monograph No. 1483, Resolution AP-CSP (99) 5, Pharmeuropa 12 (2) .
22. Helboe, P. Certification Procedure; Purposes and Procedure The Feed-Back Mechanism, Proceedings of the International Conference on the Vision of the European Pharmacopoeia in the 21st Century, July, 1997, Pharmeuropa, Special Issue, Workshop Session II.
23. Artiges, A. Certification of Suitability of Monographs of the European Pharmacopoeia; Summary of Objectives and Scope of the Procedure, Proceedings of the International Conference, Berlin, Germany, November 11—12, 1999, Pharmeuropa Special Issue 2000.
24. Certification of Suitability of Monographs of the European Pharmacopoeia. Pharmeuropa 2000, 12 (2), Resolution AP-CSP (99) 4.
25. Monographs on “Active Substances” And “Excipients.” Pharmeuropa 1999, 11 (3) .
26. Artiges, A. International Harmonisation of Pharmacopoeias ICH, Proceedings of the First International Conference on Harmonisation, Brussels, 1991, 143—152, Topic 3; Pharmacopoeias.
27. Halperin, J. A. Session 5, Harmonisation of Pharmacopoeial Monographs and Methods, Proceedings of the Second International Conference on Harmonization (ICH), Orlando, 195—217.
28. ICH Guideline on Specification on Drug Substances and Drug Products, (Q6A-paragraph 2.8) .

(乐 健 简龙海 译)



Y

药品的包装材料：玻璃

Claudia C. Okeke

United States Pharmacopeia, Rockville, Maryland, U. S. A

引言

自古至今玻璃的应用已逾 6000 年。随着对玻璃技术知识的逐年累积，玻璃已成为应用最广泛的药品包装材料。最早的合成玻璃的起源还不清楚，然而古埃及人会用砂和二氧化硅制玻璃小饰品^[1]。美国遗产词典（The American Heritage Dictionary）把玻璃定义为机械和光学性能高度可变的从熔融态固化而没有结晶型式的一大类物质。玻璃基本成分是氧化硅、氧化硼、氧化铝和五氧化二磷，通常为透明或半透明的，在物理上，玻璃被视作一种超冷的液体，而不是良液体^[2]。

美国材料试验协会（American Society for Testing and Materials, ASTM）把玻璃定义为一种冷却成固体时不发生结晶的无机熔融物^[3]，ASTM 进一步说明玻璃通常硬而脆，其断面具有贝壳状结构。可为无色或有色、透明或半透明或不透明的^[3]。在结构上，玻璃是非结晶态和非定型的，由无机物或有机物制成。

玻璃是在高温条件下进行制造的。高温时，玻璃具有黏滞液体的性质，热玻璃可以精密准确地制成各种常见的形状。由于玻璃在冷却时具有不结晶的性质，使其能保持独特的透明特征。

玻璃的用途很广，用途之一为用作药包材料。由于玻璃的透明性，人们更喜欢用玻璃作为药品包装材料，可对其所包装物一览无遗。玻璃的另一优良特性是对大多数液体的浸蚀具有阻抗能力，因此与所包装的药品不产生相互作用。玻璃对气体具有完全的阻隔性能，并能以任何合适的方式进行消毒。调节玻璃的颜色还可以对所包装的产品提供对光的阻隔作用。

玻璃的组分通常有两种，钠钙玻璃和硼硅玻璃。钠钙玻璃一般用作餐具、食品和饮料的包装材料以及用作窗玻璃等。硼硅玻璃应用不太广泛，但由于其耐用性和耐热性比钠钙玻璃优良，可用于实验室玻璃仪器和耐热餐具等器皿的制造。硼硅玻璃的特性使其成为某些药品更趋选择的包装容器。下面将详细讨论玻璃的组分^[4]。

玻璃制造

1. 原材料

二氧化硅（ SiO_2 ）也称石英，是玻璃的基本成分。玻璃是在高温下（如 1550℃）熔融各组分进行制造的。由于

石英砂的熔点很高，熔融及制成容器很困难。加入其他氧化物后可使其熔点降低，使制造和应用更容易^[5]。这些氧化物包括氧化钠、三氧化二铝、氧化钾、三氧化二硼和氧化钙。其中一种或几种氧化物可降低玻璃液的黏度，便于玻璃的制造。还可加入一些物质改变玻璃的颜色，促进熔融或达到其他目的。作为自然界存在物质的化工处理产品， Na_2O 和 K_2O 有丰富的来源，如美国加利福尼亚州的 Searles 湖的盐水中。将钠加入硅主要是为了降低后者的熔制温度，并在合理的时间赶走气泡。 K_2O 用得较少，但是钠、钾的加入降低了玻璃对水溶液的耐蚀性。其他添加剂，如 CaO 、 MgO 、 Al_2O_3 不同用量的加入也影响玻璃的性质。硅有很低的热膨胀系数，加入碱金属，如 Na_2O 会增大玻璃热膨胀系数。

如果在熔制过程中需要一定的流动性而不希望高的热膨胀系数，可加入 B_2O_3 ，形成硼硅玻璃。由于降低了 Na_2O 的含量，使玻璃膨胀系数减小，同时改善了玻璃对水溶液的耐蚀性。

通过玻璃的几何或键合力可以推断玻璃成型的必要条件。硅砂沉积物存在于世界的任何地方，用水力挖掘机可取得硅并可作进一步纯化，原料中可能存在的一种杂质——氧化铁会影响玻璃的颜色^[4]。玻璃配方中还可能有下列氧化物： Ge_2O_3 、 As_2O_5 、 P_2O_5 、 P_2O_3 、 As_2O_3 、 V_2O_5 、 Sb_2O_5 、 V_2O_3 、 Na_2O_5 和 Ta_2O_5 ^[6]。钠钙玻璃和硼硅玻璃均能制成琥珀色。加入氧化铁可制得琥珀色玻璃。紫外到近紫外的可见光通过琥珀色玻璃的透过率极低，因此琥珀色玻璃瓶可以为对光较敏感的药品提供必要的保护。

需用电离辐射进行灭菌的药品，所包装的玻璃配方中可加入 1% 或 1% 以下的氧化铈，电离辐射（剂量可达 20～30kGy 或 2～3Mrad）会使玻璃发暗，不利于最终产品的检验。

电离辐射使玻璃发暗的机理：在辐射作用下，玻璃结构中的电子被轰出，形成颜色中心，通常是中密度或低成本玻璃，引起了多价电子变化，吸收可见光使其变得不透明。其结果是带中性原子，如钠原子凝聚成胶体状构型。配方中加入多价的氧化铈后能获取游离的电子，避免了灭菌过程中玻璃颜色变深^[4]。

制造玻璃的所有原材料要符合一定的标准，如粒度、粒度分布、总体纯度、杂质含量，各种原材料要尽可能对粒度进行匹配以减少熔制过程中的问题。

在玻璃成型中所产生的碎玻璃在熔制过程中可回收利用。作为原料用的碎玻璃，含有所需要的组分，应进行分类管理。碎玻璃的使用节约了原材料，对熔制过程也有一定的好处。图 1 为玻璃制造流程的示意图^[1]。

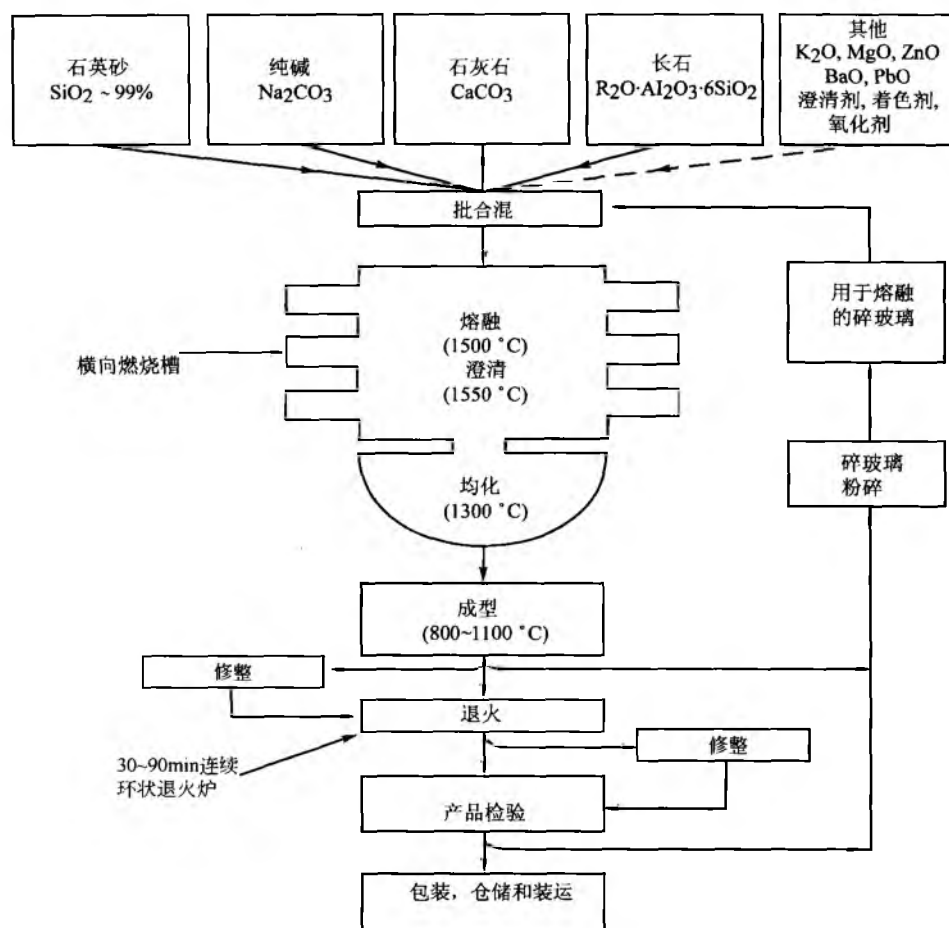


图1 按玻璃类型进行变化的玻璃制造温度

2. 配方-批混合、加料和熔融

典型的玻璃厂以熔制时玻璃的组分情况组成批的，原材料储存在大容量仓库中，按工厂设备类型的不同，原材料可由计算机程序控制，按配方比例进行混合。电脑对原料输送装置、称量设备、从各自仓库中取出一定量的各种原料卸入大的混合料容器混合等过程进行程序控制。混合一定时间后，将料卸入混批罐，再运到熔炉的加料口投料。称重、混料以及混合料的输送都要有记录。

通常，混合料投入玻璃窑炉后，按一定次序在合适的温度下进行熔融、溶解、挥发和原料间的氧化还原等作用^[7]。在熔炉中，物料通过螺杆送入炉中，温度高达1700℃。先浮在玻璃液表面上，逐渐熔融成一定的组分。窑炉必须有一定的温度以使其熔融，在工业上可接受的时间内使其形成均匀一致的玻璃，玻璃在窑炉中保温直到形成均匀度满意的产品，然后降低窑炉出口的温度使玻璃达到成型操作时必需的黏度。

在大部分情况下，玻璃不是以批作为其特征的，而是以出炉的日期和时间进行划分的。因为玻璃熔融是一个连续过程，即使混合物料不是连续加入的，但在窑炉中的滞留时间足以使其混合充分，因此无法以每个加料罐作为玻

璃的批特征^[4]。

熔制、成型或二次处理过程中如有不受控制的晶体生成，会使玻璃透明性消失（即脱玻现象）。脱玻会影响玻璃的光学性质、机械强度，有时还会影响玻璃的化学耐用性。在玻璃内部均匀的或在玻璃-空气界面处以及玻璃折射界面处不均匀生长的结晶都是我们所不希望的。脱玻现象主要发生在处于最大成核速率的最佳温度中的玻璃，而此温度又跟晶体生长最大速率所需温度重合。如果在这种临界温度时间太长或在冷却时穿越临界温度太慢就会发生结晶化。对于钠钙玻璃，脱玻临界相为850~900℃。但因为此时玻璃液已有相当高的黏度，临界温度范围又比较窄，所以脱玻作用（即透明消失）不会成为太大问题^[1~3]。

玻璃制品的质量

产品制成后要进行一些质量观测，其一是观测玻璃的均一性。大部分玻璃厂希望确保玻璃的组成始终一致，但在熔炉中玻璃液中未及逸出的气泡会影响其一致性。

玻璃中的气泡来源于熔融中的化学反应。具体有如下几种原因：①碳酸盐或硫酸盐的分解产生气体；②物料细粒中包含的气体逸出；③含水物料中水分的气化；④混合

料中氧化状态的改变,如红铅。然而,在熔炉中只要时间充分,这些气体通常会慢慢地逸出玻璃液至顶部。有时,气泡会引起玻璃的回收。这些气泡分为玻璃内的气泡和表面凸起的气泡,都是不希望有的,可能会引起最终产品的废弃,这依尺寸和程度而定。玻璃容器表面有破气泡时,可以认为功能有缺陷;如果气泡在玻璃中,可认为是外观缺陷,不存在使用上的风险,但仍可能被拒收。

结石是玻璃配方的又一种情况,应避免出现。在熔炉的特定区域,因搅动不良会形成结石。这称为均匀化操作不当。玻璃是在很高温度下熔融的,此时,某些组分可能会从表面气化,造成局部区域黏度很高,如果有少量这种玻璃液混入正常黏度的玻璃液时,就造成了看上去窄而长的不均匀区域,这就是结石^[4]。

批间离析、熔融离析、挥发、温度波动以及窑炉耐火砖被侵蚀而脱落,也会造成条纹或结石。可以通过熔融匀

质化和强烈澄清作用加以防止。扩散、流动及强力澄清剂的使用,以及玻璃冷却前进行对流混合达到均匀化,还可借助持续剪切玻璃液的机械混匀机和静态混合机进一步改善其均一性。

气泡和结石是两种熔制过程中经常发生的缺陷,应尽可能予以避免。

澄清是从玻璃液中驱除气泡(玻璃内气泡或表面气泡)的物理化学过程,澄清剂通常在高于熔制过程所需温度条件下起作用。硫酸盐和钠、钾的硝酸盐以及 As_2O_3 和 Sb_2O_3 的混合物常用作澄清剂。三氧化二砷用于高温下(1450~1500℃)熔制的玻璃;三氧化铋用于稍低温度熔制的玻璃(1300~1400℃)。随着玻璃的冷却,氧气泡由于与 As_2O_3 和 Sb_2O_3 作用生成五氧化物而被去除^[1]。

通常钠钙琥珀玻璃液中会有气体逸出,使用澄清剂一般能解决问题^[8],典型的钠钙琥珀容器玻璃的配料见表1。

表1 琥珀色钠钙玻璃容器玻璃的典型混合料组成

混合料	原料质量	原料中提供的各氧化物/kg					LOI ¹⁾
		SiO_2	Al_2O_3	CaO	Na_2O	FeO	
石英砂; SiO_2	300	299.3	0.2	—	—	0.03	0.5
纯碱; Na_2CO_3	100	—	—	—	58.3	—	41.7
石灰石; CaCO_3 ²⁾	90	—	—	49.0	—	0.02	40.7
长石 $\text{SiO}_2 \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$ ³⁾	40	26.4	7.6	0.4	1.3	—	—
食盐; NaCl	4	—	—	—	2.1	—	—
粉煤 ⁴⁾	9	—	—	—	—	—	9
黄铁矿 ⁺ FeS_2	1.4	—	—	—	—	0.84	0.6
碎玻璃	460	333.7	9.2	48.8	67.2	1.03	0.1
总产量	1004.4	659.4	17.0	98.2	128.9	1.95	94.6
实得产量(kg) 以及各氧化物百分含量	909.8	72.48	1.87	10.79	14.17	0.21	—

1) 熔制损失量,碳和硫的氧化物(以及澄清剂中的次氯酸盐)在熔制过程中有部分逸出。

2) 还含有 0.2kg (或 0.02%) 的 MgO 。

3) 还含有 4.1kg (或 0.45%) 的 K_2O 。

4) 主要用于还原 Fe_2O_3 为 FeO , 使玻璃呈琥珀色, 尽管玻璃熔制中的氧化还原会影响澄清作用。

1. 配料和熔制中的质量检测

注射剂包装容器制造需要对所有的过程进行严格的控制,从原料开始到玻璃、玻璃容器及医疗设备部分的测试。质量控制程序应保证玻璃的理化指标符合规定,并避免不合格产品进入药厂。

正常的操作要确保原材料符合规定,在装载和运输中保持完整。每一种原材料均有物理和化学性质的要求,通过控制混批和熔融过程和最终产品的所需的性质来满足这些要求。通常玻璃容器所要求的属性决定化学杂质的量,例如,含铁低的原料一般用于制造无色玻璃容器,硫含量

少的原料(存在硼硅玻璃情况中)可减少熔制过程产生的气泡,应避免原料中存在有害物质,否则这些有害物质可能在最终产品的灭菌和随后的储存过程中从玻璃中抽提出来^[4]。

大部分原料供应商对所供的原料提供分析报告,以供接受方做进一步验证。这些有关原料的资料应予保存。检查供应商的生产设备确保原料在装载和运输过程中没有不同级别的原料混入。这是一个理想的状况,应成为以质量为宗旨的原料供应商和玻璃生产商的目标。碎玻璃也看作是原料,碎玻璃要进行适当的处理,防止不同组分的相混及外来污染物混入。就像防止从厂外购入的原料被污染一

样重要。

应特别注意以合格的技术配制玻璃配方，每一种组分的配方由批记录提供，包括玻璃类型、熔窑编号、生产日期、各原料数量、总的批总量和预期玻璃产量。在一些公司，技术部门对批记录实行严格监控，记录上的每一项更改都要有各级部门的批准。因为要处理碎玻璃，这种情况可以变化。批记录还提供指定组分在指定熔窑中的连续时间记录，批记录要提供给实际称重、混合原料的部门。大部分公司通常会在计算机监控下进行原料的混合操作，包括自动称重、混合及输送等。在将批配方输入计算机时要特别注意持续检查输入的准确性。

接下来是对所生产的玻璃进行试验。试验程序是建立在以下基础上的：①玻璃熔制是在大的熔窑中连续操作的，产品的物理和化学性能相互有关联；②在大型熔窑中连续熔制不致发生突然的组成变化，就像分批生产时会发生的那样；③由于熔窑尺寸和容积较大，熔窑中发生的变化很慢，必须周期性地取样、测试，进行监控。对于选定物理性质的测定能确定所有其他相关的物理性能，也能判断其化学组成^[4]。

每天从各个生产工位要抽取样品进行一系列试验，以下这些试验需经常进行，以确保产品质量：

- 热合应力 (seal stress)；
- 软化点 (黏度)；
- 退火和应变量；
- 密度；
- 透光率；
- 化学耐蚀性；
- 化学分析。

大部分生产厂每天要进行玻璃热合应力测试，了解玻璃组成的波动。通常取样用熔封或熔融到与产品设计组分相同的标准玻璃上，组分上的任何偏差均可以通过测定熔封的应力反映出来。此试验判断的物理性能是热膨胀系数，该系数对碱含量的变化很敏感，碱含量又影响玻璃的耐蚀性。如果测试结果与内控规格有一定的偏差，应修改混合料配方并发有调整后的批指令单。修改配方的作用应在第二天产品中得到体现。

另一些测试可以每周、双周或每月间隔进行，所有这些测试结果提供了在线的玻璃质量的框架。如果每天的热合应力、每周的软化点以及每两周的化学耐蚀性试验令人满意，可以说每月的化学分析一定和设计目标一致。如果其他的测试也令人满意，可以说任何时间生产的玻璃的耐蚀性也是令人满意的。此外，联网的数据库可以供药厂证实，任何时出产的玻璃都能满足其特殊要求。

2. 药品容器的成型过程

药品容器可用吹模法制造，也可用玻璃棒或管成型法制造。一般用吹模法制造容量在 100mL 以上的大注射剂瓶，100mL 以下小容量瓶用管成型法。

这节虽然只讨论药品容器，但任何形状和大小的玻璃制品，如瓶、罐等都可以用熔融玻璃液，按设计的形状和用途通过模制法、牵引法、压延法、骤冷法制造。

2.1 吹模法

吹模法使用刚从玻璃窑炉放出的玻璃液，放出的玻璃液必须具有成型所需的温度和黏度。在玻璃熔窑出口端，玻璃液流过熔窑的底部的小孔称为喂料口。由一对冷刀片逐段切断玻璃液称吹模物料。物料的体积正是制造一个容器所需的玻璃。物料送入空的初模中，通过压缩空气吹压成跟铸铁模具内部形状一致的形状。压缩空气再反向吹，形成的瓶子翻转后移到吹模中进一步吹制。模具口装以铰链，模具口打开时瓶子可以移出，制得的瓶子送入一个称为退火的冷却过程，在不受力的条件下冷却至室温。压-吹机械，如 Hartford-Empire 机器是吹制机械的一种，用于制造饮料包装用瓶等，吹-吹机械制造过程见图 2。

吹模法可制成无色或有色的保护产品避光的玻璃容器。与后面需讨论的管制工艺相比，吹模容器瓶壁厚，抗冲击能力强一些。管制容器的壁厚更均匀，这在某些应用场合会很关键，如壁厚可能会影响光检测设备。同时吹模容器瓶底部较厚，这会影响冻干过程中热的传递。

2.2 管制法

Danner 工艺为制造玻璃管的常用机械过程，另外下面将描述的手工拉管工艺，所制得的玻璃管能精密控制外径 (OD) 和壁厚，玻璃管最大外径是 40mm，这不是由制管工艺限制的，而是由制造容器的工艺限制的。在手工拉管工艺中，一个工人和两个帮手可手工控制长约 15m，外径约 140mm，壁厚 2mm 的玻璃管。一团重达 30~35kg 的玻璃液，插入一根吹管，在玻璃团中心吹气泡。工人边吹气边旋转，一个帮手一边旋转，一边拉伸着走远，玻璃管的长短和直径由帮手走路的速度进行控制，另一帮手在规定时间内以风扇吹冷玻璃管，进一步控制玻璃管长度和直径。利用此法可将一团玻璃液制成用作温度计的长达 150m 细玻璃管^[1,4,9]。

在 Danner 工艺中，温度合适的玻璃液缓慢流到由耐火砖或铂合金制成的倾斜旋转轴上，玻璃管从转轴处向外拉伸。以旋转轴心处吹入压缩空气，借助空气的膨胀作用维持玻璃管大小，空气有一定压力，防止玻璃管端塌陷。玻璃温度决定了玻璃管的直径和壁厚、充气的压力以及玻璃管从旋转轴牵拉的速度。图 3 为 Danner 工艺的典型示意图。

玻璃管充分冷却后切割成合适的长度，逐段送入管制容器成型机。在管制工艺中，能发生不均匀的发夹形的条纹和表面的挥发。管制工艺可生产安瓿、粉针剂瓶、注射器针管、笔式注射器用玻璃套筒以及用于药剂的多种容器^[4]。



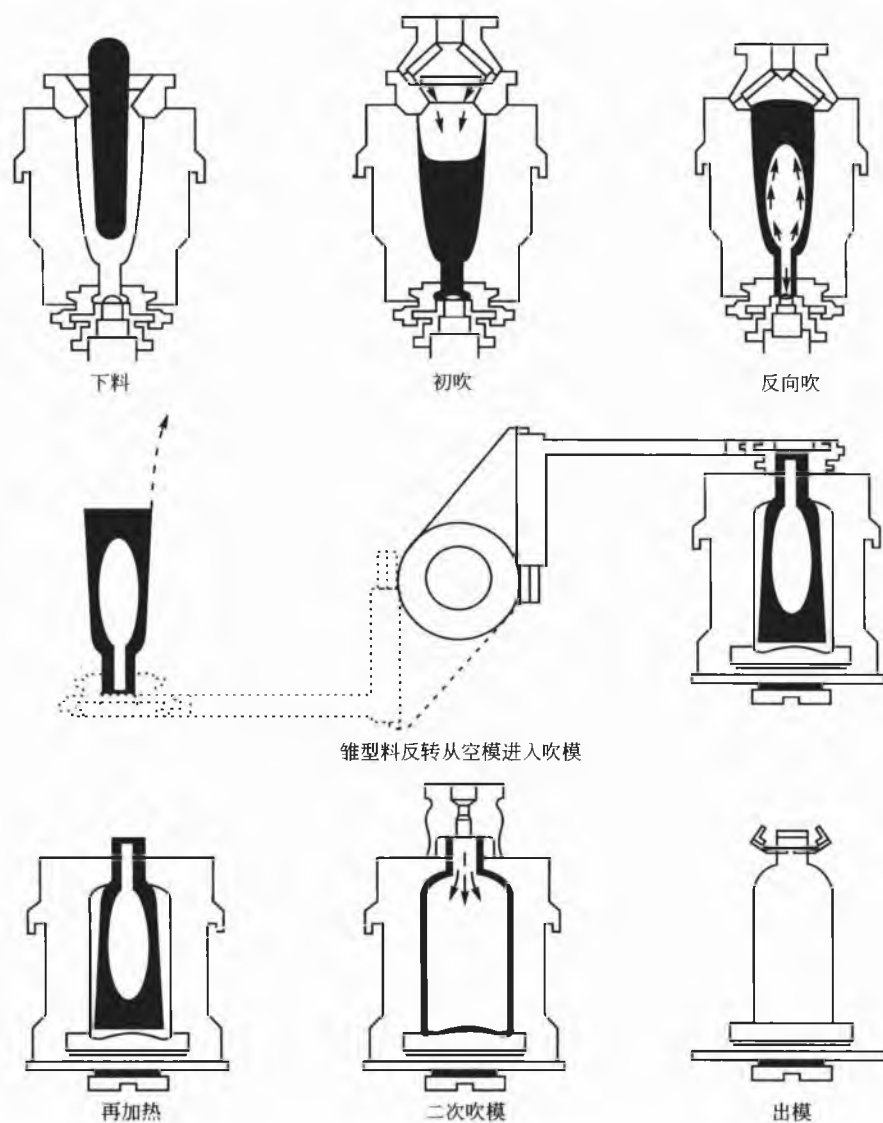


图2 H.E 为一种吹-吹法机械^[9]玻璃料落入初型模中，以压缩空气吹，然后反吹，锥形料反转并送入吹制模中最终吹制成型

另一种制管工艺为 Vello 法，在该法中熔融玻璃液穿过水平环和垂直钟状物之间的环形带流入旁边的几乎水平的滑槽，跟 Danner 法一样，以适宜的速率稳定地牵出口径符合规定的玻璃管。由于 Vello 法玻璃液在所需尺寸的固定前炉中冷却至合适黏度速率快，Vello 法比 Danner 法生产速度快，但 Vello 法操作较为困难，最适宜长时间的、尺寸变化少的产品生产^[1]。

跟模制容器相比，管制容器质量轻、尺寸控制好、壁厚和底厚更均匀，较适合自动检查系统应用。无色或阻光玻璃容器均适用于管制工艺。

玻璃组成、性质和分类

1. 钠钙玻璃

这种组成的玻璃适合于制造日用品。钠钙玻璃原料极易得到，成本不高。这些原料在中等温度下可满足需要。钠钙玻璃有较高的热膨胀系数，但对所包装的产品只具有中等程度的抗蚀能力。

钠钙玻璃在实际上要比钠、钙字面上成分复杂，如前所



述，这种玻璃还含有 MgO 、 Al_2O_3 、 B_2O_3 或 K_2O 及不同的着色剂，还有 Na_2O 、 CaO 和 SiO_2 。矾土提高钠钙玻璃的化学稳定性， MgO 能防止脱玻。90% 的玻璃为钠钙玻璃，用作容器、平板玻璃、玻璃器皿及某些光学产品^[1]。

在钠钙玻璃熔制时，氧化铁少量的硫和还原剂相互反应，产生琥珀色，因而钠钙琥珀色玻璃称为还原琥珀玻璃，典型的钠钙玻璃和硼硅玻璃的组分见表 2^[4]。

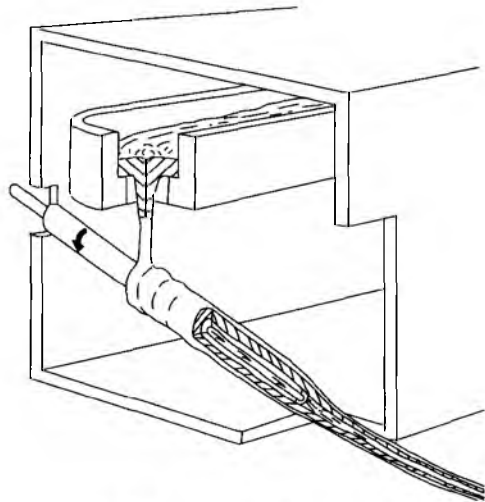


图 3 制造玻璃管的 Danner 方法

表 2 钠钙和硼硅药用玻璃的典型组分和热膨胀值

典型组分和热膨胀值	质量百分比							
	钠钙玻璃				硼硅玻璃			
	模制法		管制法		模制法		管制法	
	无色	琥珀色	无色	琥珀色	无色	琥珀色	无色	琥珀色
SiO_2	73.0	71.9	67.7	67.8	66.7	80.4	72.0	69.2
B_2O_3	—	—	1.5	13.6	9.5	12.9	11.4	10.4
Al_2O_3	0.8	1.9	2.8	5.8	5.3	2.6	6.8	5.4
CaO	10.7	10.6	5.7	1.1	1.8	<0.05	0.5	0.4
MgO	0.4	0.8	3.9	<0.1	<0.1	<0.05	0.2	0.3
BaO	—	—	2.0	2.4	1.2	—	—	2.1
Na_2O	13.5	14.1	15.6	8.3	7.4	4.0	6.4	6.0
K_2O	0.3	0.3	0.6	0.8	1.0	—	2.4	2.3
TiO_2	—	—	—	—	—	—	—	2.8
Fe_2O_3	—	0.3	—	—	1.3	—	—	1.0
MnO	—	—	—	—	6.0	—	—	—
热膨胀值	88	90	93	56	59	33	55	54

2. 硼硅玻璃

硼硅玻璃是为满足比钠钙玻璃更严格的要求而发展起来的。由于组分不同，硼硅玻璃需要较高的熔制温度，用的原料也较为昂贵。因此硼硅玻璃比钠钙玻璃要贵一些。

硼硅玻璃称为耐热玻璃，其热膨胀系数比钠钙玻璃低，比较能耐受温度的快速变化（耐热震性）。硼硅玻璃广泛用于实验室玻璃仪器、化学管道和排水管、家用餐具。硼硅玻璃具有杰出的化学耐蚀性，更适合于实验室仪器和药品包装容器。硼的助熔作用弱化了硅的网络结构，促进了硅

的熔融，这是由于三价硼的存在，在高温时，弱化了硅网络的键合力。基于热膨胀系数的不同，硼硅玻璃又分为两类。

硼硅玻璃中，由氧化铁和氧化钛或由氧化铁和氧化镁相互作用而出现琥珀色，硼硅玻璃一般不用还原剂生色，故硼硅玻璃琥珀色称为氧化琥珀色。

3. 玻璃的性质

流变学、熔融、成型、退火过程以及在高温时应用的限制都跟玻璃的黏度有密切的关系。玻璃的黏度与玻璃的

性质有关。玻璃的黏度在一定的温度下,介于 $10 \sim 10.5 \text{ Pa}^{[13]}$ 或 $10 \sim 100 \text{ P}^{[14]}$ 之间,同时玻璃的黏度是相对定量的。加入改性剂能改变玻璃在某些温度时的黏度,在低温时,改性剂对玻璃黏度的作用按改性剂配位价而定,配位价高的改进剂由于填充抑制趋于提高低温黏度^[1]。

ASTM 提供了本章所讨论过程和选用的参考点的定义。常用的参考点是退火点和应变点,以下摘自 ASTM^[3]。

- 退火:减小玻璃剩余应力至商业可接受并且改良了结构的可控冷却过程。

- 退火点 (A.P):以方法 C336 测定时,指玻璃纤维特定伸长比率对应的温度;或以 C598 方法测定时,为玻璃束折射中点特定比率相应的温度。

- 退火范围:玻璃应力以商业上实用的速率消除的温度范围,为了比较玻璃,一般定在退火点和应变点之间。

- 应变点 (St.P):以方法 C336 测定时,指玻璃纤维伸长特定比率对应的温度;以方法 598 测定时,为玻璃束与折射中点特定比率相应的温度。

- 软化点 (S.P):以 C338 法测定时,指均匀直径的玻璃纤维以本身质量造成的延伸特定比率相应的温度,软化点和黏度与密度和表面张力相关。如密度 2.5 g/cm^3 的玻璃,表面张力 300 dynes/cm 则对应于黏度 $10^{6.6} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 时的温度即为软化点。

在应变点,玻璃内部应力在数小时内得到释放^[4]。

Margnles 黏度仪是一种校正仪器,玻璃液置于旋转架上,测其受力情况用于玻璃黏度的测定。玻璃通常在 $5 \sim 50 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ ($50 \sim 500 \text{ P}$) 的黏度范围中熔制和加工,但成型和最终所需黏度往往不一样。硬玻璃通常有较高的软化点,软玻璃的软化点较低。玻璃长度可用以解释其应变点和软化点的差距。长的玻璃通常其软化点和应变点有较大的差距,表示温度降低时长玻璃的凝固慢于短玻璃^[1]。

硼硅玻璃成型温度约需 1000°C ,而钠钙玻璃则低于 1000°C ,退火过程对成型玻璃应力的消除是非常有用的^[10],硼硅玻璃合适的退火温度范围是 $600 \sim 650^\circ\text{C}$,钠钙玻璃稍低一些。在此温度范围内数分钟后,可消除应力,退火后慢慢冷却至室温可保持其无应力状态。

4. 热膨胀

在判断玻璃容器经受温度剧变的能力(即抗热震性)方面,热膨胀系数是很重要的。玻璃的热膨胀决定了能安全密封的物质范围。热膨胀系数特征表示了温度变化时玻璃产品尺寸上变化情况(如长度)。尺寸上的变化又决定了玻璃上产生的张力情况。玻璃作为热交换体热屏障的能力,以及玻璃熔制和成型的难易取决于热传导和扩散性。大部分情况下,玻璃会热胀冷缩,如果热循环足够慢,则不会有滞后作用。温度对热膨胀的斜率即称为热膨胀系数 α ,大部分玻璃在 $0 \sim 300^\circ\text{C}$ 之间的热膨胀系数为常数。玻璃温度非常接近应变点以上 5°C 时,热膨胀系数会很快增加。在极限环境中易于损坏使用的玻璃,应在采纳任何用途的最终设计前进行试验。

钠钙玻璃膨胀率大,受的力也大,受热损伤可能性也大一些。硼硅玻璃的热膨胀系数较小,抵御较大温差的能力大一些。这在升温较快的场所,如干热灭菌、冷冻干燥以及其他场所中显得很重要。

稳态热梯度造成的应力会不会造成玻璃破损,视某些部分对其他部分的制约程度而定。在某些类型的玻璃中可观测到热应力阻抗(面对面的温度差)造成的张力。将玻璃从热的炉子中取出,突然冷却会在其表面产生张力,内部形成了压缩补偿应力。另外,骤热也导致了表面压力和内部张力。这两种情况下,所产生的应力都是暂时的,当温度均匀时,会慢慢消失。由于玻璃只在表面张力的作用下破碎,即使所有表面同时加热或冷却。玻璃骤冷时比骤热受到损伤更大一些通常通过实验可测定耐热震性能,玻璃受到的力在瞬间力作用时比持续力作用时要大,把物品加热到适当温度再扔到冷水里可观测到其抗热震性能。例如, 150°C 抗热震性,是把玻璃加热到 150°C 后放进 15°C 水中。当用其他冷却介质,冷空气或油时可进行更高温度的热震性试验^[1]。

玻璃容器降温时,热震性取决于温差和达到最低温度所需时间。玻璃作为一种材料可以耐受很低温度,但为了避免破损,必须有足够的冷却时间。尽管看起来厚玻璃壁因为强度大能更好地耐受热震,事实上薄的玻璃抗热震性能更好一些,因为它能更快适应温差变化情况,减少由温差引起的应力^[4]。

热膨胀系数跟玻璃组分有关。通常人们认为膨胀系数越小越好,但事实不一定如此。如果把膨胀系数约 90 的钠钙玻璃和膨胀系数为 $33 \sim 55$ 的硼硅玻璃相比,情况是这样,但很少会在这种热膨胀系数范围内挑选硼硅玻璃。大部分情况下,这种范围的热膨胀系数均是令人满意的。如果要求更快的冷却速度,应选择热膨胀系数最低的玻璃。

玻璃容器特性——模制和管制工艺的比较

如前所述,玻璃容器生产有管制和吹-模两种方法。管制容器最大容量约 50 mL ,最大外径约 40 mm ,吹-模法更适用于制备较大的体积,如 100 mL 以上大容量的容器。但在尺寸上,吹-模法生产的容器的高度可变性造成瓶壁、瓶底厚度和质量的较大可变性^[4]。

制造容器用的玻璃管尺寸较为稳定,包括壁厚、壁均匀性、横截面和准直度,这正是严格控制的结果。容量越小,尺寸越准确、精密。同时,管制容器和模制容器的玻璃缺陷也不同,主要由于制管的工艺造成的缺陷不同。如模制容器会有气泡(球形或卵形),而管制容器只可能有在拉玻璃管时形成的气泡线。

两种容器内表面组分也有不同。玻璃必须加热到足够高的温度以便于容器的成型,因此,玻璃中的某些组分在高温时逸出表面,冷却时在表面凝结。这种效应在模制容器中较为罕见,因为在成型过程中各个工序逐步冷却,减



弱了逸出的趋势。管制容器在成型过程中玻璃管的特定部位要反复加热，结果是瓶子的某些部位要上升到很高温度，而其他部位仅处于室温以上。典型的例子是瓶底的形成。高温造成 Na_2O 和 B_2O_3 及其他氯化物逸出，凝结在靠近瓶底的侧壁上。在退火时，可重新气化凝结的沉积物，或在清洗时将其除去。

冻干制剂所用的管制瓶要进行特别的讨论，应综合考虑瓶子和产品性质进行适当的设计。冻干制剂中使用模制瓶，尽管可以进行生产控制，但达不到管制瓶的独特效果。可以应用同样的设计，但控制更少。

冻干制剂包装用瓶的设计和使用应注意下列各点：

- 产品性质；
- 装量；
- 抗热震性；
- 玻璃组分；
- 容器壁厚度；
- 容器外形；
- 容器表面缺陷。

冻干剂种类繁多，产品冻干行为不同，包装用的容器应与真正的药品一起进行评估，而不能用试验溶液进行模拟。

药品的冷冻和解冻使玻璃内部产生应力，如容器过量灌装，过大的压力会引起容器破裂，所以灌装量少于 50% 较合适，最好是 35%。

对抵御药品冷冻中所受的力和保证热通过瓶底传导，玻璃容器的外形是很重要的。尽可能减少侧壁和底部之间的角度，以减少由角度引起的应力作用，侧壁和底部的锐角情况是最不好的，角度太大是不利的。瓶底中心部位有少许突出有利于热量传递。这与玻璃瓶底部角度平缓变化同样重要，都能改善性能。

上述决定满意性能的因素都受到容器表面损伤的不利影响。容器应尽可能没有抓痕、磨损、损伤等，可能符合设计标准。灌装生产线也要防止损伤玻璃表面，应尽可能减少与尖利金属物体接触。以上讨论的这些因素影响，除了低热膨胀系数常常是首先或唯一考虑的因素^[4]外，上述因素也同样重要。

1. 化学性能——耐蚀性

ASTM 对化学耐蚀性的定义：玻璃表面物理和化学的持久质量。依据长期浸蚀或储存后产生的化学和物理的表面变化或容器内容物的变化可以作出评估^[3]。

与其他容器或包装材料相比，对化学侵蚀的抵御能力是选择玻璃作为包装容器的主要理由之一。玻璃依其组成不同和所用溶剂不同，其耐蚀性可从可溶到高度耐用变化。用于包装注射药品的玻璃和与注射液和注射用粉末直接接触的玻璃必须有良好的化学耐蚀性。通过测定质量减失、玻璃或最终容器表面的质量变化、分析与药品接触的溶液，可以评价玻璃的耐蚀性。测试方法：在湿热灭菌条件下，考查高纯水对大小均匀的玻璃颗粒的加速侵蚀。此外，还

可以将不同化学组成的玻璃制成粒径均匀的颗粒，比较水溶液对其侵蚀情况。这些过程将建立玻璃的特征耐蚀性。当然存在其他因素，如玻璃组分在高温成型时会沉积在玻璃表面，或其他的挥发性沉积物会降低其化学耐久性。

玻璃加速实验条件下受到水浸蚀时，玻璃的碱性成分（主要为钠）与溶液中氢离子交换，溶液 pH 会升高。提高 pH 会降低玻璃的耐久性。pH 升高，对所包装的注射剂产品影响较大，加速玻璃品浸蚀。可用稀酸滴定测得 pH 变化程度，滴至中性所需稀酸的量与玻璃被浸提出的碱的量相等。浸蚀程度还可通过测定溶液中的特定组分，如钠、硼、钙、铝、硅的分析而定。中和提取液所需稀酸的量还与从溶液中直接分析发现的某些玻璃组分相关。耐蚀性好的玻璃所需的中和酸量更小，溶液中组分的浓度更低。这些观测通常适用于玻璃颗粒试验和容器试验，但由于容器试验的表面与溶液体积之比太小，使得酸体积和组分浓度更低。

玻璃与酸反应可能是浸出过程，也可能是完全溶解过程，如氢氟酸通过溶解硅的网状结构腐蚀硅玻璃。其他酸，如盐酸或硝酸可能会对某些玻璃有些溶解作用，反应机理：玻璃表面的碱被抽提，同时，在扩散控制过程中取代质子。

用 95℃ 的 5% NaOH 可以测定碱与大部分硅玻璃的反应的溶出速率，反应机理同样包括与酸相似的完全溶解过程。弱碱溶液可浸出和溶解，有时与玻璃的组分非常相关。对于强碱溶液，温度每提高 10K 或 pH 每升高一个单位都可成倍提高浸蚀速度。通常实验室器材使用更耐碱的玻璃。

如前所述，水浸蚀与酸浸蚀机理相似，低碱、高铝或硼硅玻璃的耐水蚀性更好。玻璃的风化是水、 CO_2 和其他组分作用的结果。水起初被玻璃吸收，跟玻璃中的碱性成分交换变成碱性盐溶液，继续与玻璃接触会产生更多的损坏。其结果是，玻璃风化耐受性跟耐酸性无关。玻璃的加速风化试验是在 50℃，98%RH 的环境试验室中进行。

钠钙玻璃和硼硅玻璃的化学耐蚀性比较表明，硼硅玻璃远比钠钙玻璃的耐蚀性好。在颗粒试验中，硼硅玻璃中和滴定所需稀酸比钠钙玻璃的需酸量少 10~20 倍，这是由于硼硅玻璃中碱含量很低。硼硅和钠钙玻璃容器内表面耐蚀试验也可得到同样的结果。因此，如果必须控制玻璃瓶与所包装的产品之间的相互作用，一般会选择硼硅玻璃，如注射剂。

2. 特别处理

成型后玻璃容器要进行特别处理，可以在退火前或退火后进行。在此仅讨论印刷和“硫”，以改善内表面化学耐久性。

2.1 印刷处理^[4]

药品容器的印刷涉及两方面：一为容器制造厂印刷有关信息；二为药品制造厂在包装好的容器上印刷有关信息。容器的印刷由玻璃厂进行是很重要的。与此相关的问题很多，其中之一是对药品类型以及批号等药品信息的印刷，

在印刷过程中制造厂要严格确保容器批号的完整。

玻璃上的印刷材料有瓷釉和环氧树脂二种,通过加热和紫外固化。环氧树脂印刷一般在退火后进行,因为温度会破坏这些材料;瓷釉材料印刷在退火前进行,退化时温度有利于瓷釉的烧结。

瓷釉提供了最持久的印刷,釉在性质上很像玻璃,与玻璃结合得很牢固,化学上又经久耐用,很耐磨损,有极高的硬度。要仔细选择与玻璃相配合的釉,釉与玻璃的热膨胀系数若有明显差异会引发一些问题,釉的热膨胀系数比所附着的玻璃应稍大一些,在容器最终灭菌后的冷却过程中,玻璃容器在釉-玻璃表面产生压力但不产生张力。玻璃的耐压性能要明显强于耐张力,但对所附着的玻璃不存在明显的危险。

釉用于安瓿的易折位置,在安瓿颈部涂上釉使之成为易于折断的色环易折安瓿,便于药液的抽出。色环用于易折安瓿,其功能是作为张力点,当用力折时安瓿颈会断裂,药液可以抽出。使用釉标记可以产生一致的安瓿折断力。

2.2 内表面处理^[4]

有时沉积物会融入玻璃表面,除去较为困难,会影响内表面的耐用性。对沉积物进行化学中和可以解决问题,同时改善玻璃耐受过腐蚀性产品的内在能力。因此,管制容器表面处理中有两方面得益:一是去除残留沉积物;二是改善玻璃表面的碱耐受性。这两个益处可以同时得到。对模制瓶而言,虽然没有沉积物问题,但能从中受益。

硼硅玻璃瓶如果包装 pH8 或以上的药品,需进行内表面处理,否则玻璃会受到药品的侵蚀,生成可溶性或不溶性污染物。不可溶性污染物有不同的形态,称脱片或闪光物等。片状物质实际上是玻璃受药液侵蚀从玻璃表面剥落下来。这些污染物的存在证明了玻璃受到药液过度侵蚀。表面处理可提高玻璃抵御药液侵蚀的能力,使玻璃表面在包装 pH8 或更高的药液不会有问题。

表面处理的基本点是移去玻璃表面的碱,提高玻璃对水溶液侵蚀的耐受能力。在碱或钠移走后,可以完全阻止导致玻璃表面侵蚀时的离子交换过程,玻璃中的钠离子被药液中的氢离子替换导致了药液 pH 上升,又进一步促进了玻璃表面的侵蚀,如果玻璃表面可供离子交换的不稳定的钠离子变得极少,那么药液中氢离子就不能轻易离开,其结果是 pH 只有极小的上升,玻璃也只受到了极少的侵蚀。

在氧气存在的条件下,通过与 SO_2 的反应或与 SO_3 反应,生成硫酸钠,除去玻璃表面的钠。反应结果。这是一般去除钠的办法。

吹模法容器表面处理包括几个步骤:模制瓶出模还未进退火炉前,有很高温度,此时充入以下一种或者几种气体的混合物:三氧化硫、二氧化硫和氧气或 1, 1-二氟乙烷。如要进行有限的表面处理,这一步就足够了。由于此时温度很高,退火时还会升高,这些气体与玻璃表面的钠反应马上就开始,在冷下的瓶子包装之前可以清晰地看到

瓶内表面有一层白色雾状物,这就是反应产物——硫酸钠,在清洗中很容易把此产物除去。模制瓶如经过这二步处理则可以达到很高的耐蚀性,这两种处理方法只适用于瓶口较大的大玻璃瓶。管制小瓶由于气体进入困难,要用不同的方法处理。

由于残留沉淀物的不利作用,以及 pH 较高的药品常用管制的小体积安瓿和抗生素瓶包装,对管制瓶进行有效处理极为重要。管制容器的处理方法基本与吹模法相同,即在高温下用硫的化合物与玻璃表面的钠反应,进退火炉前在管制容器中注入 3% 的硫化铵溶液零点几毫升,退火过程中通常温度为 600~650℃,硫化铵溶液会分解,分解产物为硫酸蒸气或者三氧化硫,再与玻璃表面的钠和残留沉积物反应,反应产物有硫化钠雾状物的特性。

有效的表面处理使容器的化学惰性显著改善,长期储存不会影响包装的药品。由于处理后的内表面改善是持久的,即使重复高温灭菌也不会失效。

表面处理的另一个理由是改进钠钙玻璃的耐蚀性,钠钙玻璃的表面惰性一般不如硼硅玻璃,表面惰性经硫化处理后能得到改善,原先一般不考虑用钠钙玻璃包装的产品可以用处理后的钠钙玻璃包装,因为钠钙玻璃较为便宜,往往选用经处理的钠钙玻璃而不用硼硅玻璃包装较温和的产品。必须注意这一点仅对模制瓶适用,这一类玻璃按美国药典分类法为 II 类玻璃,在后面将介绍药用玻璃的美国药典和其他的测试和分类方法。

先不谈 II 类瓶子的测试和分类问题,管制硼硅玻璃容器的内表面处理有效性的测试方法令人关注,前面提到玻璃耐蚀性或惰性的考查方法是测试所包装的溶液的 pH 具体测试方法有几种,容器包装水溶液后在 121℃ 高压灭菌 60min 后,测溶液 pH 升高的情况,可在指示剂作用下用稀酸滴定至中性终点,其他还可以观察灭菌前后由指示剂变色所表现的 pH 变化。方法所用的指示剂之一为溴百里酚蓝,先将溶液 pH 调至 5.8~6.0,灭菌后颜色变化与 pH 范围至少为 7.5 的标准色相比, pH 升高情况可通过颜色变化估计的。本章后面会介绍美国药典规定的水侵蚀试验所要求的灭菌次数和温度。

处理良好的容器所包装药液在高压灭菌后 pH 上升非常小。实际消耗的滴定液的量或 pH 上升幅度,依赖于很多因素,包括容器大小,因为容器大小决定内表面积与溶液体积的比值^[4]。

玻璃和玻璃容器的分类

USPⅪ首次收录了玻璃器皿的化学标准,提供了注射剂用玻璃容器的规定要求。USPⅪ^[11,12]进行了增补,并对 4 种玻璃容器进行了定义。

药品包装用玻璃容器是直接接触药物制剂的玻璃制品,除了美国药典,欧洲药典(EP)等都认同了从 USPⅪ到 USP24^[13]对药用玻璃容器分为 4 类的规定。这种分类法建立在玻璃对水侵蚀的化学抵御能力或称耐水性基础上的。



在规定条件下，在浸液介质影响下，玻璃受浸蚀程度可测定玻璃表面释放出来的碱的量。在某些情况下能测得的碱量非常小。在 USP24-NF19 第 661 节容器中^[13]，对试验设计和玻璃分类都有具体描述。这些测试要求在无尘的区域进行。

1. 玻璃类型

USP 和 EP 对于玻璃的分类一般如下。

1.1 I 型玻璃容器

I 型玻璃容器由硼硅玻璃制成，具体成分为 80%SiO₂、10%B₂O₃ 及少量的 Al₂O₃ 和 Na₂O，为惰性玻璃，热膨胀系数很小，温度突变时产生裂纹的可能性极小。I 型玻璃通常用于制造注射用的安瓿和抗生素瓶，用于包装可能由碱性氧化物的溶入而使 pH 升高，进而影响其功效的药品^[5]。

USP 对 I 型玻璃的描述

高度耐蚀的硼硅玻璃，通常用于包装酸性或中性注射剂，如稳定性试验数据能证明其适用性，也能用于碱性注射剂的包装^[13]。

EP 对 I 型玻璃容器的描述

一种化学组成为高耐水性的玻璃，用于包装针剂以及人血和血液成分的制剂^[14]。

1.2 II 型玻璃

组分中 Na₂O 和 CaO 含量较高的、经脱碱处理的钠钙玻璃。对浸泡液的耐蚀能力稍逊于 I 型玻璃，但强于 III 型玻璃。欲使 II 型玻璃或其他类型玻璃提高耐蚀能力，可用 SO₂ 对其表面进行处理，使表面氧化物转化为在后处理时能洗去的可溶性盐，这种处理对于一次性使用的容器或需重复加热的容器很有效。II 型玻璃熔点较低，易于加工，热膨胀系数比较大，可用于包装经缓冲能维持 pH7 以下的药液^[5]。

[USP] 经脱碱处理的钠钙玻璃，一般用于酸性和中性注射剂的包装，如果稳定性试验数据能证明其适用性，也可包装碱性注射剂^[13]。

[EP] 以表面处理得到的具有高度耐水性的钠钙玻璃，适用于中性或酸性水溶性注射剂的包装^[14]。

1.3 III 型玻璃

III 型玻璃含有跟 II 型玻璃一样量的钠和氧化物，但含

有更容易浸出的其他元素氧化物的钠钙玻璃，由于具有高度反应性，III 型玻璃只用于不含水分的液体或干的产品包装^[5]。

[USP] 为一种钠钙玻璃包装容器，除非有合适的灵敏度试验表明其适用性，一般不用于注射剂的包装^[13]。

[EP] 具有中等耐水性的钠钙玻璃，只用于非水注射剂和粉针剂以及非注射剂的包装^[14]。

1.4 IV 型或 NP 玻璃

[USP] 普通用途的钠钙玻璃，用于非注射剂如口服药或局部用药的包装^[13]。

[EP] 耐水性较低的钠钙玻璃，用于非注射用的固体制剂，以及部分非注射用液体或半固体制剂的包装^[14]。

2. 测试

药用玻璃容器必须符合有关的试验要求，如 EP^[14] 中耐水性试验以及 USP^[13] 中化学耐蚀性试验。各国药典试验过程和方法稍有不同，本章仅着重介绍 USP24-NF19 提供的内容。

表 3 为 4 种玻璃的试验类型及规格限度。

USP 提供了三种试验过程和限度。它们是玻璃颗粒试验、水浸蚀试验和砷试验，下面介绍这些试验用仪器和试剂^[13]。

2.1 测试用仪器

高压灭菌容器：能维持 $(121 \pm 2.0)^\circ\text{C}$ ，带有温度计、压力表、放气阀以及在水面以上至少可容纳 12 各试验容器的搁物架。

碾体和杵：由淬火钢制造，按附图的规格制成。

其他仪器：约 20.3cm (8in)、由不锈钢制成的包括 20 号、40 号和 50 号筛、底座和盖子组成的标准筛。（参见标准筛孔径 $<811>$ ）。以耐浸蚀玻璃制成并以特定方法老化的 250mL 锥形瓶，900g 铁锤，永久磁铁，干燥器及某些定量容器。

2.2 测试用试剂

高纯水：为试验用水，放水阀前以在线电导池检测，在 25°C 时电导率不得大于 $0.15\mu\text{S}/\text{cm}$ 。必须保证不被铜或铜制品如铜管、蒸馏器、接收器污染。高纯水由蒸馏水经过一个包有核级树脂混合床的筒状去离子器，再经过纤维

表 3 USP 玻璃类别，试验类型和限度

玻璃类别	试验类型	限度	
		容器大小 ¹⁾ /mL	0.020mol/L 酸的毫升数
I	玻璃颗粒试验	全部	1.0
II	水浸蚀试验	100mL 或 100mL 以下	0.7
III	玻璃颗粒试验	全部	8.5
NP	玻璃颗粒试验	全部	15.0

1) 以容器满刻度容量表示的容器容量（按 USP24-NF14）。

素酯滤膜(0.45 μ m孔径)而制成。不要使用铜管,放水前要冲洗放水管路。如电导率高于规格要求,则须重新进行上述处理。

甲基红溶液:取 24mg 甲基红钠溶于高纯水,加水至 100mL。(如需要,可用 0.02mol/L NaOH 或 0.01mol/L H₂SO₄ 液进行中性化),100mL 高纯水加 5 滴指示剂滴定至变色,所用 0.02mol/L NaOH 不得大于 0.02mL,此时的 pH 为 5.6^[13]。

2.3 I、II、NP 型玻璃的颗粒试验

随意取 6 个或更多的容器,以纯水淋洗后用洁净干燥空气吹干,敲碎至约 25mm 碎片。取约 100g 碎片一分为三,其中一份放入碾钵中,插上杵,以铁锤敲击 3~4 次,移至 20 号筛。反复操作剩余两份碎片,直至分别全部通过 20 号筛。用力摇动筛子刻倒出 20 号和 40 号筛上的玻璃,重复击碎和过筛过程,倒空底盘,装上组合筛,机械摇筛约 5min(或手动)。将留在 50 号筛上的颗粒(应超过 10g)移入一带盖容器,置干燥器中待测。

将样品铺在一张蜡光纸上,磁铁吸去在击碎中可能引入的铁屑,再将样品移至 250mL 耐蚀性能强的细口锥形瓶中,每次用 30mL 丙酮淋洗 6 次,每次振摇约 30s,小心倒出丙酮,淋洗后的样品应不呈凝聚状,玻璃颗粒表面不应黏着细粉,140℃烘干烧瓶及内容物 20min,将颗粒转移至称量瓶中,置干燥器中冷却。开始试验至干燥时间不应超过 48h。

试验步骤:取玻璃颗粒 10.0g,精密称量,置于已事先用高纯水浸洗(90℃老化 24h 以上或 121℃老化 1h)的 250mL 锥形瓶中,加入 50.0mL 高纯水。另取一空锥形瓶作同样的操作作为空白,取事先也经过同样处理的硼硅玻璃烧杯倒置盖住瓶口,锥形瓶置高压灭菌锅中,打开放气阀,加热至排气阀喷出稠热蒸汽 10min 后关闭排气阀。升温 19~23min 至 121℃,在 (121 \pm 2.0)℃保持 30min,关闭加热后开始降温,并在 38~46min 内降至大气压。如需要可放气以防产生真空。取出锥形瓶,立即用流动水降温,将瓶中的水移至合适的容器中,颗粒用水淋洗 4 次,每次 15mL,淋洗液并入容器中,加 5 滴甲基红试液,立即以 0.010mol/L 硫酸滴定(如所需滴定液不到 10mL,则使用微量滴定管)。记录 10g 样品浸出液滴定至中性所需滴定液

体积,并以空白校正。滴定液体积不得超出玻璃分类表中(表 1)的规定^[13]。

2.4 II 型玻璃的耐水性

随机取 3 个或更多容器,用高纯水彻底淋洗。

试验步骤:每个容器加入约为满口容量 90%的高纯水,从“盖上锥形瓶”开始,按玻璃颗粒试验操作,灭菌时间改为 60min,至“预防形成真空”结束。将 1 个或更多容器中的浸蚀液全部并于 100mL 量筒中,混匀,容量小的容器,可合并浸蚀液至 100mL。量筒中的液体移入 250mL 耐蚀锥形瓶中,加 5 滴甲基红试液,趁热以 0.010mol/L 硫酸滴定。从高压灭菌器打开至滴定结束应不超过 60min。记录 0.010mol/L H₂SO₄ 消耗量,滴定结果以 100mL 同样温度的高纯水,同样量的指示剂的空白试验校正,不得超过表 1 规定^[13]。

2.5 砷试验

从 1 只 I 型玻璃容器中取 35mL 水按上述玻璃耐水性试液制备阶段进行(容量小的容器可将多个容量所含水合并),按 USP24-NF19<211>节砷试验进行。试验限度为 0.1ppm。

2.6 透光性试验

除了以上的测试外,对于有色避光玻璃容器还要进行透光性的补充试验。用于避光或阻光性的容器要符合透光性试验要求,无色的和琥珀色硼硅玻璃的透光性图谱见图 4。

使用灵敏度适宜的分光光度计对有色玻璃容器的碎片进行透光性试验,透光率不得超过表 4 所列的限度。

以上这些试验的具体方法在 ISO、DIN、ASTM 对玻璃的限度要求和标准中基本上是相似,每个补充方法的标准中的限度要求、预测结果和步骤可以有所不同。

玻璃容器内表面试验与玻璃材料颗粒试验是不同的。在玻璃颗粒试验中,玻璃表面面积对溶液体积的比例要高一些,高温过程后玻璃组分在溶液中的浓度也要高一些,便于溶液分析和对各种玻璃的区分。其他主要差别为有无沉积物产生,对于管制容器,沉积物可影响试验结果,模拟容器试验结果不受沉积物影响。

表 4 I、II、III 型玻璃限度

常用尺寸/mL	450~2990nm 波长最大透光率	
	火焰封口容器	盖封容器
1	50	25
2	45	20
5	40	15
10	35	13
20	30	12
50	15	10

注:摘自 USP24-NF14。

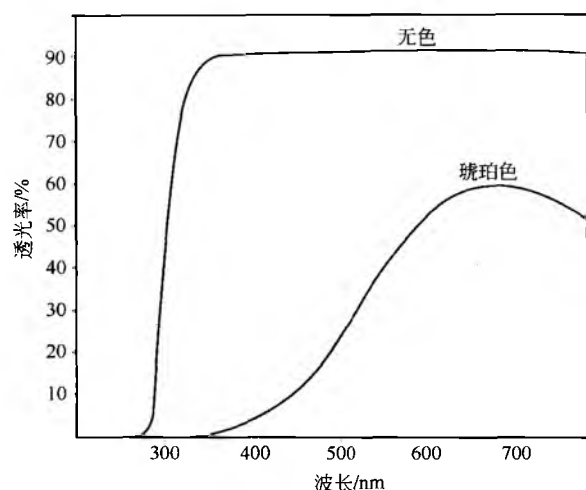


图4 无色和琥珀色硼硅玻璃的典型透光性

总结

玻璃作为包装材料有许多优点，包括：

- 对气态污染物有完全阻隔性；
- 能完全阻止内容物易挥发成分从容器壁逸出；
- 非常透明并有诱人的外观；
- 易于清洗，易于加热灭菌；
- 对除 HF 及其他腐蚀性之外的所有液体的耐蚀性；
- 可以有不同的形状并可用各种不同类型的盖子；
- 易于灌装、加盖、整理、贴标签和装盒；
- 优良的抗压能力便于有效储存，允许在仓库中以纸箱堆放；

- 易于热灌装。

玻璃的缺点，包括：

- 易碎，碎后成为为数众多的尖锐碎片；
- 质量 2~2.5g/mL，脆而厚的瓶底，使之相当重；
- 有时，玻璃的质量及制造类型导致其成本较高，价格昂贵。

参考文献

1. Boyd, D. C.; Danielson, P. S.; Thompson, D. A. Glass. Encyclopedia of Chemical Technology; Kroschwitz, J. I., Howe-Grant, M., Eds.; John Wiley, Inc.: New York, 1994; 12, 555—623.
2. Glass The American Heritage Dictionary, 2nd College Ed.; Houghton Mifflin Company: Boston, MA, 1991; 561.
3. ASTM Standard C162-88, Standard Definitions of Terms Relating to Glass and Glass Product. Annual Book of ASTM Standards; 1999; 15.02, 1—14.
4. Abendroth, R. P. Glass as a Packaging Material for Pharmaceuticals. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1993; 7, 79—100.
5. Jenkins, W. A.; Osburn, K. R. Packaging Drugs and Pharmaceuticals, Drug Packaging Materials. Cooperation with Institute of Packaging Professionals; Technomic Publishing Co.: Lancaster, PA, 1993; 99—102.
6. Goldschmidt, V. M. J. Soc. Glass Technol. 1927, 11, 337.
7. Woolley, F. E. Engine Red Materials Handbook; ASM International; Bilthoven, The Netherlands, 1991; 4, 386—393.
8. Spinosa, W. C.; Stephen, P. M.; Schorr, J. R. Review of Literature on Control Technology Which Abates Air Pollution and Conserves Energy in Glass Melting Furnaces; Nov 11, EPA-600/2-77-005, /2-76-269, /2-76-032b Corning, Inc.; Battelle, Columbus, OH, 1977.
9. Giegerich, W.; Trier, W. Glass Machine Construction and Operation of Machines for the Forming of Hot Glass; Kreidl, N. J., Ed.; Springer-Verlag; Berlin, 1969.
10. Pincus, A. G.; Holmes, T. R. Annealing and Strengthening of Glass Industry; Magazines for Industry, Inc.: New York, 1977.
11. Containers for Injection, USP XII; United States Pharmacopeia; Rockville, MD, 1942; 567—576.
12. Containers, USP XIX; United States Pharmacopeia; Rockville, MD, 1975; 643—647.
13. Containers <661>, USP 24-NF 19; United States Pharmacopeia; Rockville, MD, 2000; 1930—1935.
14. Containers; European Pharmacopoeia, Council of Europe; 67075 Strasbourg Cedex France, 1997; 172—185.

(严幼达 译)

Y

药品的保存

Peter Gilbert

David G. Allison

University of Manchester, Manchester, United Kingdom

保存

很多年前人们就已经知道微生物可以破坏药品，这种破坏因为使药品变质而使药品的药效降低或者使用药的患者发生感染。使用预无菌成分在无菌条件下生产后的无菌药品（单剂量或多剂量）需要加入抑菌剂。而当药品经过最终灭菌后，只有多剂量形式药品需要加入抑菌剂。在后一种情况中，加入抑菌剂的目的是为了保护药品以及避免患者在使用过程中因微生物进入引起的不良后果。抑菌剂因此加入到多剂量灭菌制剂以及非灭菌的水性药品中。它们的作用是把微生物的数量降低到可以安全应用药品的程度，并且在药品的储存以及使用过程中使微生物数量保持在或者低于这个程度。因此抑菌剂必须在药品的保质期内

稳定，以及能应付患者对药品的滥用（如使用中对药品的污染，不正确的保存等）。表1按照化学基团的字母顺序列出了药品保存中常用的抑菌剂。

对于多剂量的无菌药品来说，抑菌剂必须在使用间隔中重建无菌条件，而对非灭菌局部应用的化妆品来说抑菌剂的作用仅是防止微生物数量的增长。抑菌剂的相关毒性往往限制了它们使用的浓度；所以在眼用制剂和注射药品中经常采用较低的抑菌剂浓度。在选择抑菌剂时要考虑其抗菌活性、所期望的杀菌速率、处方中的其他成分和处方 pH 的影响。

BP (1988) 中“药用抑菌剂的效力”试验中清楚地指明抑菌剂首先必须杀死微生物，其次能抑制微生物生长。然而它坚持要求没有微生物的增长，也就是有足够的抑菌剂的残余活力以抑制任何残留微生物的增长。

表1 一些广泛应用的防腐剂的性质

抑菌剂	优点	缺点	应用
酸（有机）： 苯甲酸、对羟基苯甲酸酯， 山梨酸	对细菌、真菌有活性	依赖于高 pH	口服和局部用药；咀嚼片和糖浆
醇： 乙醇或异丙醇、氯丁醇、溴 硝醇	广谱，包括抗酸细菌	不稳定；对有机物渗透性很差	溶剂剂；滴眼剂和注射剂；协同性质
醛： 甲醛、戊二醛	广谱，抗真菌和杀孢子活性	酸型溶液中随温度升高失活； 毒性和致癌	化学灭菌和手术用仪器（如内诊镜）的保存
双胍： 氯己定、聚六亚甲基双胍 （PHMB）	主要以阳离子形式对抗革兰氏 阴性细菌	水不溶；会被有机物失活；有 限的抗真菌活性	隐形眼镜洗液等
卤素： 次氯酸盐、聚维酮碘、氯仿	广谱，细菌、真菌以及滤过性 毒素	不稳定；腐蚀性、会被有机物 失活	目前使用有限
有机汞： 汞、银、硫柳汞、醋酸苯汞	抗细菌广谱	对有机物、离子和一些非离子 表面活性剂能力较低；毒性	滴眼剂、隐形眼镜洗液
酚酸： 甲酚、氯甲酚、双酚	便宜、对革兰氏阴性和真菌作 用迅速	低水溶性；被橡胶吸附；不稳 定，有刺激性，对 pH 有依 赖性	乳膏
季铵化合物： 西曲溴铵、苯扎氯铵	抗菌谱窄（革兰氏阴性细菌）； 有表面活性剂性质	对有机物作用小；在酸性 pH 活性低；与肥皂、离子和非离 子表面活性剂不能共存	滴眼剂、外用乳膏、软膏

术语的定义

消毒剂 (disinfectant)、抑菌剂 (antiseptic)、防腐剂 (preservative) 都是能破坏或者抑制微生物增长并为了实现这个目的而应用的化学品。这些或者其他经常使用的术语定义如下:

消毒剂: 对人体皮肤表面具有刺激性或者毒性的化学试剂或处方, 但是用来降低非生命物体表面微生物数量至安全限度。

抑菌剂: 可应用在人体表面对抗微生物的化学试剂以及处方。

防腐剂: 能降低物体或区域中可繁殖微生物数量至可安全应用的程度的化学试剂以及处方, 并且能将处于使用中的或储存期的产品的可繁殖微生物的数量保持或低于一个限度。

细菌抑制 (bacteriostasis): 微生物生长暂停或被抑制的一种状态。

杀菌剂 (bactericide): 降低微生物群的活力的一种化学抑菌剂。如果不指明应用的浓度就没有意义, 应用的浓度随微生物种类不同而变化。

抑菌剂 (bacteriostat): 在不同的营养环境中可防止微生物生长的一种化学抑菌剂。如果不说明有效浓度就没有意义, 抑菌浓度随微生物的种类不同而变化。

值得注意的是并不鼓励使用杀菌剂和抑菌剂这些术语, 在 USP 和 EP 中, “抑菌剂 (antimicrobial agent)” 已经取代了上述术语。

理想防腐剂

目前还没有绝对完美的防腐剂, 目前材料只是很多相对立性质的一种折中。下面是理想防腐剂的性质, 在选择防腐剂时需要考虑。

(1) 清楚化学式: 许多现有的防腐剂, 如季铵化合物, 是各种同系物的混合物。通常得到的抗菌活性与混合物的组成有关。除非可确定和控制混合物的处方, 否则即使这些成分符合药典标准, 它们的抗菌活性也易变。

(2) 抗菌谱广: 这些化合物必须具有广谱的抗菌活性, 可以对抗所有种类的微生物以及细菌的孢子内壁。实际上真正能满足这一要求的化合物是甲醛、戊二醛、次氯酸盐和环氧乙烷。在药品中使用的灭菌浓度下所有这些化合物均具有高刺激性。但是, 低浓度的甲醛在洗发剂中有应用, 在这种情况下, 与皮肤的接触是短暂的, 刺激也是最低程度的。季胺类化合物、酚酸、对羟基苯甲酸酯类具有良好的抗革兰氏阴性菌活性, 但对孢子仅有很小或没有活性。某些革兰氏阴性菌如假单胞菌事实上对这些试剂有耐药性。通常很难实现抗真菌活性。有时采用几种抑菌剂的组合物以扩大抗菌谱, 包括真菌、细菌、酵母和孢子。

(3) 有效性: 其必须在广泛的 pH 条件下均有效, 从

而保证在所有处方中都有效。事实上, 其或者在酸性或者在碱性条件下更为有效。因此, 药用处方中的 pH 决定其适合的类型。

(4) 稳定性: 在药品的保质期内其必须对光以及高温稳定。pH 对稳定性的影响应当最低。因此要注意溴硝醇只在暗处和酸性 pH 条件下稳定, 在光亮处和碱性环境它迅速降解成甲醛, 但浓度太小无抗菌活性。对光不稳定可通过避光容器包装而避免。所有药品都要进行储存试验, 以保证在保质期内的最后阶段仍然有的足够量。

(5) 溶解度: 其浓度应该远低于处方中的主要成分。它们的溶解度应能使它们以浓溶液加入到药物处方中, 同时又不会使溶液饱和。

(6) 美观: 其应无明显气味、颜色、味道, 否则可能影响药品最终的外观。对化妆品来说这一性质至关重要, 而对于药品重要性稍差。

(7) 挥发性: 其应该没有挥发性。氯仿不理想是因为当药物处方暴露在空气中时, 就会挥发而丢失。

(8) 产品不相容性: 其不应与任何可能的药用成分不相容。这包括与药物容器以及与活性成分的不相容性。事实上这很难达到。

(9) 毒性: 在使用的浓度下, 其应该无刺激性, 不产生过敏反应, 无毒。在这方面, 应用的部位最关键。由于对毒性物质的高敏感性, 仅有很少的可用于眼用药品。同时, 对完整皮肤安全的当应用在注射剂中可能是危险的。

(10) 油中的溶解度: 其一定不能具有太大的油溶性, 因为这会在两相和三相体系中产生问题, 它会聚集在油相和胶束相中, 而在生物相 (水相) 中抗菌作用就无法实现了。应注意到油水分分配系数可随 pH 和油的性质而改变。

(11) 成本: 在总的药品成本中, 其必须是低成本的。

尽管检测过非常多的抗菌化合物以确定其是否适合于保存药品, 但是其中很少 (<20) 用在目前的主要药品中。此外, 很多情况下, 对于特定产品我们选择的是不太适合的而不是最优的。

抑菌剂的动力学

抑菌剂有效性的关键致死参数是应用浓度、暴露时间、暴露的微生物种类和数量、环境或处方中的 pH 以及应用的温度。理解这些条件对杀灭细菌过程的影响, 以及描述这些依赖性的术语对在不同环境和处方中合理应用抑菌剂至关重要。

1. 接触时间

当暴露在致死浓度的抑菌剂中时, 细菌群的生存能力随时间呈指数下降 (图 1), 这种表现一级动力学可以用方程描述

$$\frac{S}{S_0} = Ae^{-kt} \quad (1)$$

$$\log \frac{S}{S_0} = kt + \log A \quad (2)$$



式中： k 是速率常数； S 是时间 t 时残留微生物的数量； S_0 可繁殖微生物的初始数量， D 值是杀死 90% 微生物的时间，即

$$\log S - \log S_0 = -1 \quad (3)$$

且

$$D = 1/k \quad (4)$$

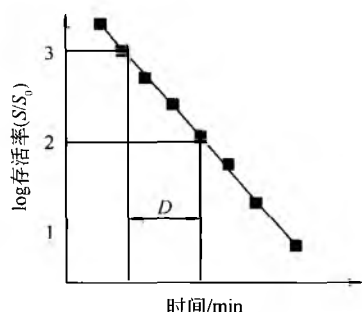


图 1 抑菌剂作用于菌群后的时间存活动力学。 D 值表示在给定的抑菌剂浓度下存活率降低 90% 的时间

实际上，这种服从一级动力学的情况在化学灭菌中很少。更常见的是，最初杀菌速率出现停滞 [图 2 (a)] 或者杀菌速率随暴露时间而下降 [图 2 (b)]，从而出现偏离一级动力学。前者当抑菌剂的浓度为最小杀菌浓度时常可观察到，它可反映出破坏细菌细胞致死所需要的时间。这种平台随抑菌剂浓度提高而降低 [图 2 (a)]，并且在高浓度下并不明显。第二种影响反映了菌群中耐药微生物的存在，对抑菌剂作用的影响以及中和剂的失效。在使用季铵化合物和双胍时常可观察到这种情况，稳定期内杀菌的水平随抑菌剂浓度增加而增加。从这些关系中，可估计最初杀菌速率 k 或 D 值（杀死 90% 的真正时间），但是这些数值的准确性值得怀疑。

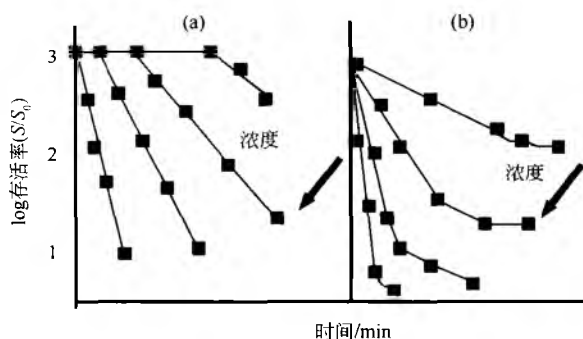


图 2 抑菌剂作用于菌群后由于 (a) 初始杀菌的延迟或 (b) 随着时间延长杀菌速率下降引起的对于一级动力学的偏离

接近一级动力学暗示出微生物对抑菌剂的敏感性一般是分散的。杀菌速率随时间降低是因为杀死的细菌细胞表面以及内部吸附抑菌剂，导致杀灭残留微生物的抑菌剂实际浓度降低。抑菌剂对这种吸附损失的易感性称为效力。

生存能力随时间指数下降意味着并不能保证对所有存活细胞的彻底清除。已知微生物数量、敏感性后，实现无

菌的可能性可指定于某一失活过程。这种指定常常错误地假定一级动力学是普遍可以接受的。

2. 抑菌剂浓度

抑菌剂的作用效果取决于使用浓度。在很低浓度时抑菌剂的作用可以忽略，中等浓度时可能只是抑制生长的作用，而仅在较高浓度时才具有杀菌作用。通常抑菌剂不同的效果是由它们不同的作用机制所造成的。例如，氯己定通过对呼吸酶和 ATP 合成的直接作用抑制细菌生长，但是可以通过造成细胞壁渗透性的变化而杀死细菌。抑菌剂的最小抑菌浓度 (MIC) 对它的杀菌活性有很小或没有参考意义，但是可以说明整个抗菌谱强度中的弱点。最小致死浓度根据抑菌剂和靶生物体可以在 $(2 \sim 20) \times \text{MIC}$ 范围内变化。在杀菌范围内，浓度指数 (η) 表示抗菌作用对浓度的依赖程度。通过对 $\log D$ 或者 k 对浓度的对数作图求得斜率可以得到浓度指数。尽管在所有生物体内这些值有轻微不同，但是它们是这类化合物的特征，并且与对哺乳动物的毒性有关。因此，浓度指数高的抑菌剂经注射给药时稀释，比那些浓度指数低的抑菌剂更容易失掉生物活性 (表 2)。

表 2 一些抑菌剂的浓度指数

化合物	指数
有机汞	0.9~1.0
碘	0.9~1.0
甲醛	1.0~1.1
苯扎氯铵	0.8~2.5
溴硝醇	0.7~0.9
对羟基苯甲酸酯	2.5~3.0
酚酸类	4.0~9.9
脂肪醇	6.0~12.7

浓度指数没有说明某一抑菌剂的活性程度，它只是表明了抑菌剂对浓度的依赖程度。如果 \log_{10} 死亡时间对 \log_{10} 浓度作图，通常可以得到直线，其斜率就是浓度指数。如果给出某一浓度和浓度指数的 D 值就可能计算出其他浓度的活性 [式 (5)]。在对微生物生长抑制和杀死过程中因为存在各种不同的作用机制，因此应该避免使用浓度指数推导 MIC 而得到杀菌情况。

$$\eta = \frac{(\log D_{C_2} - \log D_{C_1})}{\log C_1 - \log C_2} \quad (5)$$

浓度指数还可以说明，抑菌剂被稀释和 (或) 被有机死细胞或被杀死的细菌细胞吸附后失去抗菌作用的敏感度。抑菌剂在溶液中损失的抗菌活性与溶液的浓度以及它被吸附的程度有关，而与抑菌剂固有的抗菌作用无关。四种假想抑菌剂的抗菌作用和浓度指数如图 3 所示，A 和 B，C 和 D 都有相似的浓度指数，但活性不同；A 和 C，B 和 D 具有相似的活性而浓度指数不同。

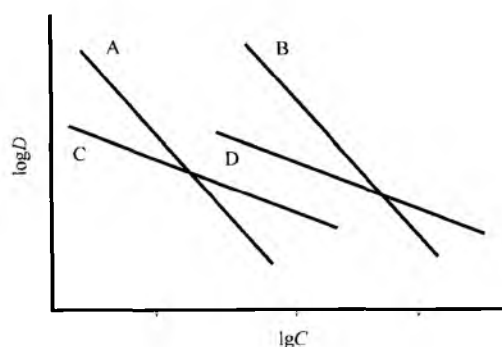


图3 四种假想的抑菌剂的活性和浓度指数的比较。
A 和 B, C 和 D 有相似的浓度指数但活性不同; 而 A
和 C, B 和 D 有相似的活性但浓度指数不同

如果使用相同中毒浓度的抑菌剂 (D 值相同), 然后通过吸附使抑菌剂的浓度下降的相同, 那么抗菌活性较强的抑菌剂损失最大 (A 和 C > B 和 D)。对于具有相似抗菌活性的抑菌剂, 浓度指数高的抑菌剂损失最大 (A > C 和 B > D)。这可归纳为容量与浓度指数和活性成反比。无菌产品中使用的抑菌剂往往具有高浓度指数和高活性。以上这些考虑对在无菌和抗菌有效实验前确定抑菌剂的失效条件很有帮助。

3. 温度影响

抑菌剂的杀菌速率直接取决于相互作用的温度, 这种关系可以用温度系数表示 (Q 或 θ), 它可通过 D 值或 k 与温度的图中斜率或者式 (6) 获得。

$$\theta_{t_1-t_2} = \frac{t_2(D_2)}{t_1(D_1)} = \frac{kt_1}{kt_2} \quad (6)$$

温度系数的下标表示抗菌活性的温度变化范围, 通常它是以每升高 10°C 的系数给出, 即 θ_{10} 或 Q_{10} , 有时也以 1°C 和 25°C 变化给出。

尽管生物体间温度系数稍有不同, 但是它是某一类抑菌剂的共同特征 (表 3)。高 θ_{10} 的化合物适合应用于温度较高的环境中, 但不适用于在温度变化范围大的药品中作为抑菌剂。

表 3 一些常用抑菌剂的温度系数 (10°C)

化合物	θ_{10}
脂肪醇	30~50
酚酸	3~5
甲醛	1.5
氯甲酚	6.0
有机汞	1.0

值得注意的是, 温度在某些情况下也会影响离子化的程度, 因此, 很明显某些化合物的浓度指数也会被温度影响。

4. pH 的影响

酸性和碱性抑菌剂的离子化程度依赖于 pH。一些化合物只有在非解离状态下具有活性 (如酚酸), 而其他一些化合物以阴离子或阳离子的形式存在时活性更大。所以在有利于形成抑菌剂活性单元的 pH 下, 某一浓度的抑菌剂的抗菌活性会加强。因此吡啶和季铵化合物这些阳离子抑菌剂在碱性条件下活性更强; 相反, 苯酚和苯甲酸在酸性介质中活性更强; 氯丁醇在 $\text{pH} > 5$ 时抗菌活性变弱, 在 $\text{pH} > 6$ 时不稳定; 醋酸苯汞只在 $\text{pH} > 6$ 时有抗菌活性, 而硫柳汞只在酸性条件中有抗菌作用; 戊二醛在碱性环境中杀灭孢子的作用可被加强, 而次氯酸盐在 $\text{pH} > 8$ 时毫无作用。

通过抑菌剂的 pK_a 可以计算任一 pH 下的未解离部分, 进而 (通过浓度指数) 算出活性程度。

$$\text{抑菌剂的未解离分数} = 1 / (1 + \text{antilog}(\text{pH} - \text{pK}_a)) \quad (7)$$

pH 还通过改变微生物体表面净电荷而影响抗菌活性。因此, 随着 pH 降低, 表面的负电荷减小, 吸附降低, 阳离子的作用强度降低了。这些影响对革兰氏阴性细菌比对革兰氏阳性细菌要显著。

5. 干扰物质的存在

在大多情况下, 在抑菌剂对一个细胞发挥作用前, 它会首先与之结合。其他材料的存在, 这里往往指的是有机物, 可能通过吸附或者使其失效进而减少能够与靶细胞结合的数量而最终降低抑菌剂的活性。外源性材料可能在细胞的表面形成一层保护膜, 因此阻止抑菌剂穿透进入它的作用部位。

抑菌剂的相互作用

直到 20 世纪 30 年代后化妆品和药品的处方中一直使用肥皂作稳定剂。尽管经常需要抑菌剂, 但是微生物的破坏几乎不成问题。随着乳剂中采用新材料作为稳定剂, 处方中的防腐或不防腐变为一个主要的问题。现在我们知道新的辅料和已应用的抑菌剂之间存在明显的不相容问题, 许多相互作用可以使抑菌剂无效。没有一套泛用的规则适用于任何一个处方的抑菌剂选择, 只有一些通用的原则。

最简单的相互作用就是处方中的抑菌剂在容器和其他辅料里面或者表面的吸收/吸附。为方便起见, 可分为胶体辅料、混悬液、金属离子和聚合物。

1. 胶体

• 胶类: 黄芪胶、阿拉伯胶以及诸如琼脂、海藻酸盐的植物类多聚糖在自然界中通常以阴离子存在, 会吸附阳离子抑菌剂如三氯叔丁醇、苯扎氯铵、取代苯酚、乙酸苯汞、硫柳汞。通常吸附程度会随着胶类或多聚糖的浓度增加而增加。黄芩胶和阿拉伯胶胶体溶液 (但不是琼脂和海藻酸盐) 经常可以通过增加阳离子抑菌剂浓度以饱和胶体

溶液后使用。而对于对羟基苯甲酸酯来说,在碱性条件下当抑菌剂充分电离后问题会更严重。

• 淀粉:与取代苯酚结合,但可通过增加苯酚类的浓度而解决这一问题。明胶与对羟基苯甲酸酯基团有轻微的相互作用。

• 蛋白质:根据处方 pH 和蛋白质的净电荷,蛋白质可能与阴离子和阳离子都有相互作用。

• 非离子表面活性剂:与一系列抑菌剂有无法预测的相互作用。阴离子和阳离子表面活性剂相互作用,对于阴离子或阳离子抑菌剂有使用禁忌。

• 聚乙二醇:与抑菌剂中的苯酚基团作用。这一作用随聚合物相对分子质量的增加而增加。随着温度升高,聚合物的热溶解加速以及进一步结合位点的产生使结合的程度增加。

2. 助悬剂

这些包括黏土、膨润土、高岭土和滑石粉。在自然界中它们通常以阴离子形式存在,并与多数阳离子剂作用,失活取决于体系的 pH。抑菌剂与黏土的结合较松散,在稀释后解脱。这种相互作用的程度很难预测。

3. 容器材料

尼龙通过共价键强烈吸附苯酚类和山梨酸。相互作用的程度受 pH、溶剂性质、温度、接触时间、表面积、抑菌剂浓度和尼龙的厚度影响。

丙烯酸和聚乙烯会影响大多数抑菌剂,包括有机汞、

苯酚类和苯甲酸类。玻璃中渗出羟基离子可提高 pH,并直接影响抑菌剂作用。因此玻璃必须通过碱性的限度测试。

将药品的容器由玻璃改为塑料可以改变抗菌效果。容器作为处方的一部分与药品同样重要。同样被橡胶塞吸收和吸附的抑菌剂可以十分显著,以酚类为例(表 4)。

两相体系中的防腐

当抑菌剂加入到油-水两相体系中时,抑菌剂根据它的亲水性在两相中分配。细菌仅在水相或油-水界面生长,因此分配到油相中的抑菌剂就起不到抗菌效果。所以水相中抑菌剂浓度降低就会影响其杀菌速率,但整个体系的容量并不受影响,因为吸附在有机残骸和细菌中的抑菌剂会被油相中的抑菌剂代替。

通过油水分配系数 K_w^o 可以很容易地预测油水中的分布[式(8)]。

$$K_w^o = \frac{C_o}{C_w} \quad (8)$$

通过抑菌剂在水相中所需浓度(C_w)、油水比例(θ)和油水分配系数 K_w^o 可以计算出抑菌剂在整个处方中所需浓度 C [式(9)]。

$$C_w = \frac{C(\theta+1)}{K_w^o(\theta+1)} \quad (9)$$

同样值得注意的是,改变油的性质可以显著影响分配系数,例如植物油和矿物油之间存在差异(表 5)。

表 4 橡胶塞吸附引起的抑菌剂损失

抑菌剂	初始浓度/% (w/v)	最终浓度/% (w/v)	损失百分率/%
苯酚	0.5	0.39	22
甲酚	0.3	0.21	30
氯甲酚	0.1	0.04	60
硝酸苯汞	0.001	0.000 05	95

表 5 不同抑菌剂的分配系数

抑菌剂	K_w^o	
	矿物油	植物油
氯甲酚	0.5	11.7
对羟基苯甲酸甲酯	0.02	7.5
对羟基苯甲酸丙酯	0.5	80.0
对羟基苯甲酸丁酯	3.0	280.0
西曲溴铵 USP	<1.0	<1.0
溴硝醇	0.043	0.11
苯氧基乙醇+对羟基苯甲酸(甲,乙,丙,丁)酯	>1.0	>1.0
硝酸苯汞	<1.0	<1.0

如果抑菌剂亲油,提高油/水的比例会显著降低有效浓度;如果抑菌剂亲水则会相反,可能造成溶解度问题。然而,除了 pH 对抑菌剂活性的影响外,温度和 pH 也可以影响分配系数 K_w^o 。

三相体系的防腐

大多数油水体系中的表面活性剂充当的是稳定乳剂的乳化剂。一些抑菌剂可能与表面活性剂直接结合,而另外一些可能进入表面活性剂的胶束内,被认为是分配中的第三相。

在某种程度上这些效应都可以计算得到, C_w 不仅取决于分配系数 K_w^o , 还受表面活性剂浓度影响。初始假定表面活性剂的胶束构成了水相的一部分。因此,如果分配系数 K_w^o 是油、水相的分配系数, C_A 是整个水相中的浓度,那么如式 (9) 所示

$$C_A = \frac{C(\theta+1)}{K_A^{(\theta+1)}} \quad (10)$$

$$\text{且 } C_w = \frac{C_A}{R}$$

而 $R = C_A/C_w$, 即 $C_A = RC_w$

同样 $K_w^o = C_A/C_w$, 即 $C_o = K_w^o C_w$

代入式 (9) 得

$$C_A^w = \frac{C(\theta+1)}{C_o/C_A^{\theta+1}} \quad (11)$$

将 C_o 代入得

$$C_A = \frac{C(\theta+1)}{(K_w^o \frac{C_w}{C_A \theta}) + 1} \quad (12)$$

将 $C_A = RC_w$ 代入式 (12), 得

$$RC_w = \frac{C(\theta+1)}{(K_w^o C_w / RC_w \theta) + 1} \quad (13)$$

简化得

$$C_w = \frac{C(\theta+1)}{K_w^o \theta + R} \quad (14)$$

通过式 (14) 可从浓度 C 、相比 θ 、油水分配系数 K_w^o 和 R 计算得到水相中的有效浓度。这很有意义,因为 K_w^o 随表面活性剂浓度不同而变化。通过 C_A/C_w 与表面活性剂浓度关系图可以得到 R , 图中的斜率就是 k 。

$$R = 1 + k [\text{表面活性剂浓度}]$$

所有抑菌剂的生产厂商都提供一系列抑菌剂的 k 值。

毒性和安全性考虑

由于自身的毒性以及潜在的副作用,抑菌剂的使用受到某些限制。《英国药典》规定含有抑菌剂的注射剂一次注射的最大量是 15mL, 而 USP 规定是 5mL。这些最大量只有在考虑了处方中抑菌剂毒性和浓度后才能作出。任何物质最终采用的浓度都是其潜在毒性和抗菌活性的平衡。此外因为脑膜易受刺激,在任何可能进入脑脊液的处方中应避免加入抑菌剂。心和动脉注射中一定不能含有任何抑菌剂。

有时证明抑菌剂对人有毒性,这并不奇怪。为了评估任何物质的毒性有必要像了解它的无效浓度一样知道它的急性毒性、累计毒性和潜在的致突变、致畸、致癌作用。此外它的局部作用和致敏作用的倾向也很重要。任何新的抑菌剂和已有抑菌剂的新应用都要经历一系列的强制实验来提供这些数据。

急性毒性

绝大多数抑菌剂在低浓度下使用,它们的急性毒性问题很少出现。但是它们的安全限度并不总是很高。

亚急性和慢性毒性

重复使用时,抑菌剂显示出的毒性可能不同,特别是在给药速率快于个体解毒和分泌速率时。一些抑菌剂含有汞,这可能在身体中蓄积。

生殖毒性

作为对所有抑菌剂常规安全性试验的一部分,要注意抑菌剂对高等动物两种性别的生育力、怀孕或产后对胎儿的影响及胚胎发育的可能影响。目前尚未证明任何常用的抑菌剂和生殖毒性存在直接联系。但是,有人指出非直接的生殖毒性,例如苯甲酸作为防腐剂能够提高血液中水杨酸的水平,可能显著增加阿司匹林致畸的可能。有机汞已被表明与天生水俣病有关,但通过使用含汞抑菌剂进入体内的浓度还未达到这种致病作用。

致癌和致突变

一些抑菌剂因为有可能的致癌作用曾被细察并被控制使用(如氯仿和甲醛)。另一种可能是抑菌剂与胺和酰胺作用形成致癌的亚硝胺。已公布的抑菌剂的致突变数据非常有限,因为在众多实验(如 Ames 试验)中抑菌剂只能在远低于使用浓度下进行。

抗菌组合物

目前已用的抑菌剂都不符合抑菌剂的理想性质。所有的化学抑菌剂的抗菌活性都有自身的局限,如有机物的耐药性、稳定性、不相容性、刺激性或毒性。同样由于新化合物进行毒性试验所带来的高成本以及并不能获得专利并为之覆盖,新的抑菌剂也就不可能得到开发。将来更有可能的是采用抗菌组合物,可能起到协同的作用,如过氧化氢和过氧剂复合物,氯己定和西曲溴铵等。抑菌剂的组合物可以用来扩大抗菌谱和抗菌范围(表 6)。例如,通过组合对羟基苯甲酸的烷基酯类,降低其水溶性使乳剂中的水相和油相均得到保护。



表 6 抑菌剂之间相互作用的例子

抑菌剂 A	抑菌剂 B		
	协同作用	加合作用	拮抗作用
苯扎铵	苯基汞	3-甲酚	六氯酚
苯甲酸	脱氢乙酸	对羟基苯甲酸酯	硼酸
苯氧基乙醇+对羟基苯甲酸(甲,乙,丙,丁)酯	苯扎铵	山梨酸	--
氯丁醇	苯乙醇	—	EDTA, EGTA
氯甲酚	苯乙醇	—	—
苯基汞	3-甲酚	—	—
对羟基苯甲酸酯	Germall	苯甲酸	硼酸
山梨酸	脱氢乙酸	苯甲酸	对羟基苯甲酸酯

当同时对同一微生物群发挥作用时,与两种相加的抗菌作用相比,抑菌剂组合作用可能提高、降低或者无变化。抑菌剂组合后至少应达到组合物中某一成分的抗菌效果。错误搭配的抑菌剂组合物会把不相关的物质引入。通常具有相同化学基团或具有相同作用结构的化合物的加入仅会起到加合作用,而引入具有不同作用机制或作用部位的化合物会加强或削弱它们各自的抗菌作用。这些影响可以通过制备两种待测抑菌剂的混合物,测定 MIC 进而确定它们的生长抑制力而得到评估。结果可用图表形式,如等效应图表示(图 4)。

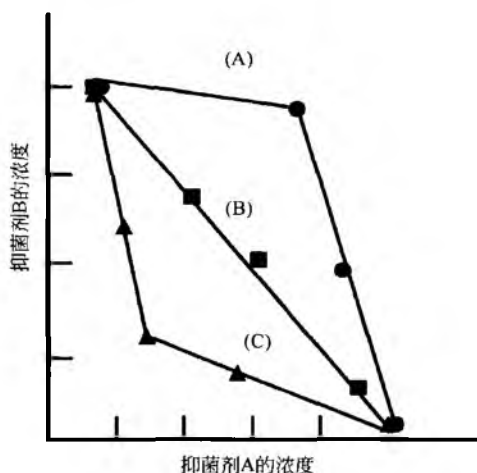


图 4 等效应图表示抑菌剂 A 和 B 相互作用的三种不同结果: (A) 拮抗; (B) 加合; (C) 协同

通常,协同效应通过三种不同的机制而发生。第一种机制通过抑制失活。此时一种化合物通过抑制微生物系统的失活反应来增加其他化合物的有效浓度,但至今还没有关于抑菌剂这方面机制的报道;第二种增效机制是一种化合物增加了另一个化合物对靶的接触,这在抑菌剂中经常发生。这通常发生在一种化合物通过增加细胞壁或细胞膜的通透性来发挥作用。除了破坏细胞外,还能增加第二种化合物对隐藏的靶接触机会。我们可以看到这种协同作用的例子,如苯扎氯胺和硫柳汞破坏细胞质膜的协同作用,因而促进了有机汞试剂和细胞质中含巯基酶的反应。这种类型的协同作用不必同时需要两个化合物均具有明显的抗菌活性;最后,可能是最广泛的协同作用的类型,两种化合物在不同的靶同时发挥作用,因而能明显地影响细胞的生物化学性质。尽管产生协同作用的靶可能是不同的,但它们密切相关。比如说,氯甲酚和 2-苯乙醇之间的协同被认为是对主动转运的质子流的产生与偶合分别发挥作用。

抑菌剂的联合使用有许多明显的实际优点,包括增加了活性谱,每种抑菌剂只需要更低的用量,因而可能减少潜在的毒性;防止了单个防腐剂的耐药性;通过简单的添加可能出乎意料地增加抗活性;将不稳定的、活性强的抑菌剂与稳定的长效抑菌剂合用,能延长保存时间;而且,基于其理化性质,细心地筛选单个抑菌剂进行组合,可能克服由单个抑菌剂的物理性质的限制而导致的微生物问题。此时,影响抑菌剂效果的因素必须仔细考虑。

(陈满仓 译)

药品的微生物控制

Nigel A. Halls

GlaxoSmithKline Global Manufacturing and Supply, Uxbridge, United Kingdom

引言

所有的药品都被期望是有效的,但是药品中存在微生物会对药品的功效产生不利影响。对任何一种特定的药品来说,微生物对其影响的严重程度取决于药品的特性、预期用途以及相关微生物的特性。一方面,当一种微生物污染的无菌注射用药品注射到虚弱的患者体内,有可能造成患者死亡;另一方面,患者也会由于微生物引起药品产生香气、恶臭或变色而拒绝或停止进行药物治疗。无论在哪种情况下,或任何与此有关的情况下,都应该避免药品中存在微生物。

药典发布了药品的微生物标准。管理部门在药物注册时也要有该药物的微生物标准。一般来说,这些标准的目的在于通过限制某些可能对人体造成危害的微生物的数量和种类,以保护公众不受感染。除了这些适用于药品本身的标准外,也有适用于药品生产环境的微生物标准。这些生产规范(简称 GMP)的目的在于确保成品的质量始终得以保证。

药品微生物控制的首要目的是尽量减少微生物污染药品的机会,其次是为了尽量降低药品已经受到污染的微生物增殖到一定水平的可能性,而不至于危害药品的功效。根据微生物的标准测试药品样品,只是药品微生物控制的一小部分。总之,微生物测试方法会破坏产品,因而很难发现一种有效的统计学取样和试验方法对批产品进行测试。成品测试充其量只是确证其不受微生物污染,如果生产控制能确保产品几乎没有可能受到污染,可以免除(广义上称为参数放行)。

对所用原料、与产品接触的包装材料、生产设施、生产过程以及设备采用微生物的标准来控制才能保证最大限度地减少微生物对药品的污染。总的来说,只有通过原料、设备以及加工过程进行保护以隔绝与污染源的接触才能保证达到控制目的。考虑到某些保护措施的脆弱性,在一些极其特殊的情况下也可以通过去除、灭活或破坏的方法来对微生物的污染进行常规控制。

应对药品持续执行微生物标准,直到该药品被患者(或医疗专业人员)使用,包括整个储存期。微生物控制存在两个问题:第一,药品上市后应如何保护(通常由其包装保护)以不受到其他污染,第二,药品应该具有一种抵抗微生物繁殖的成分以致药物服用时其微生物的污染程度仍在允许的范围內。

对不同类型的药物可采用不同类型和水平的微生物控制方法,主要分为无菌产品和非无菌产品。

无菌产品的微生物控制

无菌的定义是不存在任何能生长繁殖的活体。注射用药品和眼科用药品应该是无菌的。注射用药品必须是无菌的,是因为它们直接进入人体而未经过任何抗感染的外部物理屏障。眼科用药品必须是无菌的,是因为任何对眼睛的损害通常都是无法修复的。目前,人们还无法区分哪些微生物是致病的而哪些不是。因此,任何微生物被注射或应用到易感染组织,或用于体质虚弱以及免疫功能低下的患者,致病的可能性是很高的(眼睛的透明部分供血量很低,因而其免疫反应的敏感性要比身体的其他部位差)。

1. 无菌、无菌试验及无菌保证

无菌是个绝对的定义,即不存在任何能生长繁殖的活体。任何绝对的东西,即便是能证明的,但也是异常困难的。

1.1 无菌试验

无菌药品的标准是必须能通过无菌测试。无菌试验在美国药典(USP)第 71 章和欧洲药典(Ph Eur)第 2.6.1 部分都有具体的要求。这些要求与日本药典以及 1999 年的澳洲医疗物品管理要求基本一致,但是它们之间在细节上还存在微小差异。

无菌试验将样品直接或间接地接种到一种广谱微生物恢复培养基中,从而检测样品中生长繁殖的微生物。如果检测到了微生物的生长则表明是有菌的,如果没有检测到微生物的生长则是无菌的。也就是说,除非证明有菌,药品便假定无菌。所以,无菌测试实际上是一种有菌测试。即便在术语参考意义的重新定义下,也仅限于那些在特定的测试条件下能够生长且可辨别的微生物。很多微生物在这些条件下是不可能生长的。

当无菌试验首次出现在 20 世纪 30 年代的美国药典和英国药典(BP)时,描述方式与其他药物试验方法是一样的,即测试单一待测样品是否无菌的一种方法,一直到 1995 年的美国药典及 1968 年的英国药典才有说明。它们指出测试结果可用于该药物多批量的无菌证明。美国药典最初要求对高压灭菌处理的每批产品中抽取 10 个样品进行测试,对其他无菌产品抽取 20 个样品进行测试。英国药典则规定抽取 20 个样品测试。在目前的药典中,除个别特殊情况外,一般都要求抽取 20 个样品进行无菌试验。

然而,由于抽检的样本量小,即便是成功的结果(无微生物生长即可推断无菌“或通过”无菌测试),也不能保

证这批药品中没有一定数量受到污染。这个问题已被公认并争论了多年，早在药典规则未出版之前就开始了。1949年，Knudsen^[1]指出在用20单位作为样品测试时，如在该批药品中存在5%的污染单位，它的无菌测试的“合格”率，仍然在35%。Brewer^[2]进一步分别以20、50甚至100作为抽样测试单位进行说明，由于受到无菌试验的统计学限制，只要测试批量存在0.1%的受污染单位，在这种情况下由抽样量增加而得到的结果并不一定优于原先10作为抽样单位的结果。药典中对无菌测试的取样要求只是一种折中的做法。几十年来大家都知道这种做法从统计学的角度来讲是不安全的。这种折中做法是基于这种实验对所测样品具有破坏性，而该药品本身又必须证明它已达到高水平的保证，即该批无菌药品不包含任何有菌成分的要求。

在无菌测试中所使用的“合格”一词只不过是说它达到微生物标准或者说符合生产无菌药品的控制要求。无菌测试“合格”不能说明符合其他环境或控制标准。因为虽然“通过”测试，但这批药品中仍然可能存在一定量细菌。而从另一个角度来说，一个无菌测试“不合格”的药品却往往能说明该药品确有问题存在，而这种问题并没有被其他微生物或物理方法发现。

1.2 无菌试验的方法

无菌试验可以通过两种方法中的任一种进行：一种是直接接种法（直接迁移）；另一种是薄膜过滤法。

直接接种法是指将样品以无菌的方式直接接种至微生物恢复培养基中并且培养。很明显这种方法只适用于那些不会抑制微生物在恢复培养基中生长的药品。培养过程规定为14天。

薄膜过滤法是将样品以无菌的方式放入一定体积的非抑制稀释液中，然后通过0.45μm无菌薄膜过滤（图1）。用另外的稀释液清洗薄膜，然后将其以无菌的方式分成两份：一份加入到大豆-酪蛋白消化培养基（SCDM）中；另一份加入到液体硫乙醇酸培养基（FTM）中。

薄膜过滤方法也可采用一种用“封闭”系统，如“Millipore 无菌测试”系统。这个无菌测试系统使用两个预消毒的罐子，每只罐子的底部都封上过过滤薄膜。将测试样品接种到稀释液中，然后在一个蠕动泵的作用下进入两只罐子，再通过薄膜。在这一过程中，稀释液自动分成两部分。在样品过滤后，培养基转入到两只罐子中，采用同样的方法让SCDM进入一只罐子，而FTM进入另一只罐子。在这过程中不必对薄膜做任何事情。然后把这两只罐子在药典规定温度下进行培养。

不管采用哪一种薄膜过滤方法，SCDM总是在20~25℃的温度下进行培养，FTM在30~35℃的温度下进行。培养时间为14天。

1999年以前，药典规定的培养时间仅为7天，现在USP规定的7天只是针对最后灭菌的产品。把原来的培养时间从7天延长到14天，是一件令人感到好奇的事情。它的起因是由于澳洲管理机构^[3]发表了一篇文章，它认为有

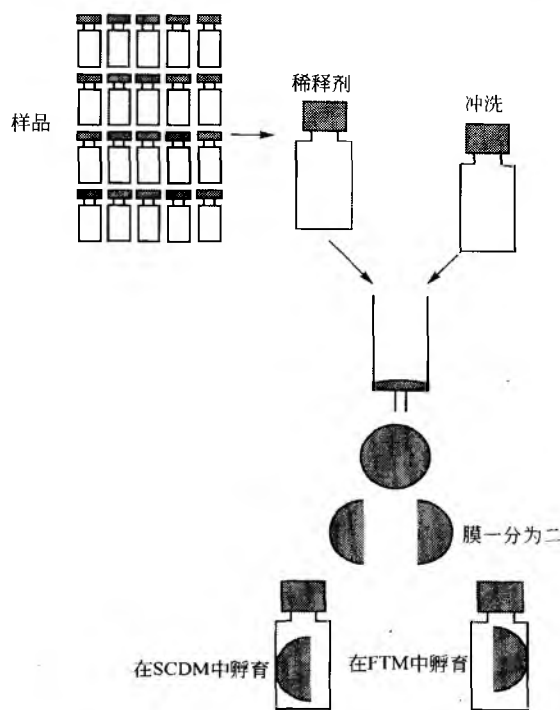


图1 膜过滤法无菌试验的示意图

些受污染药品培养7天后，无菌试验未必能测出其微生物的生长情况。其实这并不是什么新发现。Brewer和Schmitt^[4]早在1966年就注意到“生长缓慢”的微生物（如微球菌和类白喉杆菌等），在USP所设定的无菌测试条件下可能需要四个星期才能明显地生长。到目前为止还没有任何实际病例说明通过7天培养的无菌测试样品会给患者造成任何恶果。通过“统一化”讨论，人们已经达成了共识。这将对面向澳大利亚的出口商更为有利。在澳大利亚，“统一前”的要求^[5]更高、更为严格。

1.3 无菌试验的条件

无菌测试非常容易造成假阳性或假阴性结果。假阳性是指一个真正的无菌产品由于在样品的准备过程中或在测试中受到意外的污染，未通过测试。假阴性则是指一个非无菌产品由于在测试的过程中有生长繁殖能力的污染物不能生长所致。

这两种情况都会造成严重的后果。但是假阳性很容易发现，因为高频率的假阳性会造成商业上的后果，至少会延缓该产品进入市场，更糟的是停产。

药典中强调的是要避免假阴性。每一批用于无菌测试的培养基必须显示出它有能力让一些特定的微生物在微量接种的情况下生长。对任何一种特定的产品进行无菌测试必须经过重复试验证明。无论直接接种法还是薄膜过滤法，所使用的培养基不得含有任何抑制微量微生物生长的成分。

1999年，药典对有关假阳性的看法发生了改变。在USP23版第8补充条款的开头以及1999年PhEur的补充条款中都有所改变。过去无菌测试对某种程度的假阳性采取



比较宽容的做法。这样做主要是在做测试过程中大量无菌操作处理而导致试验品可能受到污染。当然，时代不同了，检测技术也不同了。

当无菌测试在 20 世纪 30 年代第一次公布时，要求最好在手套箱里做。药典认识到这样做也有意外污染的可能性。因此如果测试失败，出现阳性，可自动有权进行重测。但是自从 60 年代出现 HEPA 过滤技术以及层流技术，实际上假阳性出现的频率减少了，仍可自动要求进行重新测试。用于无菌测试的隔离技术在 20 世纪的最后十年出现。

无菌测试可以进行复试，一直到 1999 年的药典修订版才告结束。这主要由于测试技术的提高。这使在测试过程中无意造成污染的可能性小于所测产品本身的污染。目前，药典规定的重新测试只有在能够明确证明污染是在测试过程中引起的才可进行。严格来说这并不是重新测试，而是因为第一次测试本身是不可靠的。

这样一来，要进行重新测试的前提是提供测试过程中有关微生物的监测数据以及药品上市的专业判断。很多公司既要考虑到无菌测试失败而导致商业损失，又要考虑要求重新测试而与有关管理部门的意见相左所带来的行政裁决。他们认为无菌测试最有意义的前途在于隔离技术的提高。

1.4 无菌保证

就无菌测试而言，尽管给予了大量的关注、耗费了财力和物力，成品测试仍然不能确认一整批的产品是无菌的。这是因为事实上无菌测试只是针对一些特定微生物的污染，采样统计还不能说明由于非无菌给患者带来危险的受污染单位的概率。这一点已被药典所认识，特别是 PhEur。它在几年前就在第 2.6.1 章节（以前为 V.2.2.1）列出如下的论述：

……满意的测试结果只是表明在这种测试条件下未发现污染微生物。……无菌测试……只是职能部门对无菌产品进行检查而采取的一种分析方法。

那么对于成批假定为无菌的产品怎么能让公司内部的相关责任部门确认呢？答案是只能利用经过认证的生产程序。它必须有科学数据表明每一个产品均是最有可能无菌的。

这引发了第二个问题，即在声明无菌时，到底置信度有多少？最终灭菌产品的微生物存活概率必须小于百万分之一。这称为无菌保证水平（SAL）为 10^{-6} 。对无菌产品必须在技术可能的情况下 SAL 尽量接近 10^{-6} ，并规定对整个过程的控制程度使产品污染不超过千分之一，也被称为 10^{-3} 的污染率。它与 SAL 不同，只是指对操作过程的控制，而不是指实际产品中污染物存活或增殖的可能性^[6,7]。

SAL 概念是根据微生物数量在有害处理下如何减少的学术研究而建立的。1945 年 McCulloch^[8] 指出，采用蒸汽灭菌，细菌的数量在致命的高温下会以有规律的方式减少。因此，如果 90% 的活菌群在接触到高温的第一分钟内被杀死的话，那么大约 90% 的存活细菌将会在下一分钟被杀死，以此类推，直到几乎全部被杀死。

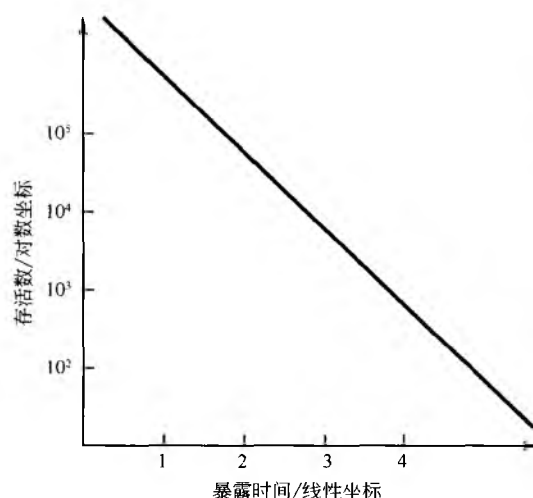


图 2 微生物的指数灭活（存活曲线）

微生物的灭活呈指数下降（图 2，指数存活曲线图），后来证明这是所有灭菌过程中微生物具有的普遍特性，指数存活曲线的对数轴是没有零点的。所以无论在什么温度下暴露多长的时间，无论多高的辐射剂量，都无法将所有的微生物 100% 地消灭。

指数灭活是无菌保证概念的基础。在特定的消毒过程中，微生物的行为是规则的，并在指数存活曲线范围之内是呈指数性的，微生物的反应也是可监控的。因此，可以用外推法获得要达到 SAL 的 10^{-6} 所需的处理条件。

这种方法不适用于无菌分装产品 SAL 的计算。这是因为无菌分装不是基于指数灭活，因而无法进行外推。无菌分装生产的原则是，药品以及包装材料必须先根据 SAL 为 10^{-6} 的要求来进行灭菌，然后才能在避免污染的条件（无菌）下进行分装。理想地说，这样的成品仍能达到 SAL 为 10^{-6} 的标准。而对理想情况的偏离主要是由无菌分装生产的技术决定的。无菌隔离技术已得到了应用，在 2000 年，尽管这一技术仍是发展中的技术而非成熟的技术，但这种技术很可能不会有什么缺陷。目前世界各国的法规管理部门名义上都能接受采用标准的技术，实现污染率低于 10^{-3} 的微生物（可通过培养基填充证明）防护水平。

2. 在无菌药品生产中的微生物 GMP

就生产角度来说，无菌产品可分为两大类：一类是指最终灭菌产品（即在灭菌之前分装和密封于容器之内）；另一类是指无菌生产产品（即先对药品及其直接接触包装材料进行灭菌，然后再进行分装，以避免受到进一步的污染）。无论对哪一类产品，都必须采取严格的措施来防止微生物的污染，但对无菌生产的后阶段来说灭菌极为重要。

对无菌产品的生产范围有关部门都有一定的标准和限制。虽然可以根据产品的类别来划分，采用具体标准来进行无菌药品的生产，这种标准对采用特定的技术有所要求，但并不规定这种技术是如何应用的。

2.1 运用于无菌药品生产的专门标准

无菌产品的生产标准主要有五个方面的来源,其中两个是强制性的、另三个是非强制性的。

两个强制性标准分别为欧盟 GMP^[9]和 1987 年 FDA 发布的关于无菌过程生产的无菌药品导则^[10]。FDA 文件在 2000 年时正在受审中。

三个非强制性标准分别为:第一个包含在 USP 的第 1116 章中。需要解释一下,这一章节在 USP 属于是通则章节,因此除非 USP 专论提及,它只能理解为非强制性的。在 2000 年时,USP 专论并未提及此章节。

第二个非强制性的标准为 ISO 13408^[11],根据国际标准组织(ISO)“医疗产品”的定义,既适用于医疗器械,也适用于药品。必须要解释一下,ISO 是一个非官方的机构,其成员来自各个国家的标准机构。ISO 标准在任何国家都不具有法律权威,除非这个国家的标准机构决定采用 ISO 标准而不是发布自订的标准。

第三个非强制性标准是“国际制药工程师协会”(ISPE)的“制药工程基本指南”^[12]。这只是 ISPE 一系列指导文件中的一个,FDA 对此文件部分认可。只有最低限度的标准才被认可,有许多原因 FDA 认为特定的无菌产品需要更高的标准。

要同时参照这五个文件并非是一件易事。它们使用不同的术语和定义,有不同的重点。着重点常常是每十年改变一次,也包括发布日期。所有这些都是关于控制微生物污染的,这些污染可能来自环境、操作人员、材料或(和)设备。这些文件中的一些个别标准甚至提到微生物的数量,还有一些提到了与污染控制有关的物理特征。

所有的这些文件都强调,要根据空气中 0.5 μm 或更大的微粒浓度进行室分级。根据分类方法,欧盟 GMP^[9]将不同区域的分级应用于无菌生产。等级 A~D 是根据一系列的独立特性确定的,如在操作和非操作条件下空气中两种尺寸的惰性微粒的浓度,在操作条件下空气中活粒子的浓度以及其他一些在表面或手上等微生物污染的指示物等。将微生物限度包括在这种分级系统内是很重要的。因为它强调决定清洁室是否适合无菌产品的生产不仅仅是空气中惰性微粒的浓度。

2.2 适用于无菌药品生产技术的普通标准

适用于无菌药品生产技术的最重要的普通标准是保护无菌生产免受空气中污染物的污染。提供给无菌生产设施的空气,必须经过过滤,而且在一些特定的情况下必须是单向的。空气的流速必须控制在一定的限度内,并且必须与周边区域保持一定的压差。

20 世纪 90 年代后期,ISO 为统一各种不同的空气质量标准,做了大量的工作^[13]。前面的三部分是有关空气洁净度的分级、测试和监控方法以及测量方法的。第一和第二部分具有广泛的基础,但与 FS 209^[14](见下文)并不一致。当这些标准公布时,出现了一个很大的问题,即各药

品管理部门对它的反对。然而我们可以确定该标准适用于 HEPA 过滤系统以及原位 HEPA 过滤系统完整性的测试,但人们仍对室分级标准持怀疑态度。

根据联邦标准 209,目前特殊标准的两个强制性部分^[9,10]都要求进行室分级。这是美国政府的标准,它目前的版本是 FS209E^[14]。这样它不会被 IS14644^[13]自动取代。因此,我们使用欧盟 GMP^[9]附件 1 的下一个修订版以及关于采用无菌生产过程生产的无菌药品^[10]FDA 导则,以决定是否在灭菌药品生产中采用这些标准。

3. 灭菌程序的控制和验证

在无菌药品的生产过程中有很多灭菌程序,但最主要的是以下三种,即蒸汽灭菌、干热灭菌和过滤灭菌。干热灭菌应用于无菌注射产品生产,是干热去热原的一部分(见下文)。

3.1 蒸汽灭菌

蒸汽灭菌广泛用于安培瓶、注射器以及塑料容器内药品的最终灭菌。它也用于塞子、过滤器、生产设备和清洁设备等等的灭菌。

高压蒸汽灭菌有坚实的科学基础(见上文)。验证蒸汽灭菌程序是为了证实高压灭菌器内装载的每一件物品都能够达到均一的温度和时间条件,并且实际达到的致死率与灭菌理论的期望值一致。

因此,满足高压灭菌器内温度一致的要求(热分布研究),是设计高压灭菌器的一个参数。而要满足高压灭菌器装载物品内温度一致(热穿透)的要求,就必须考虑灭菌物包装的方式(在适用的情况下),以及它们被如何放入高压灭菌器,包括蒸汽入口、排放口、支架、托盘和热传感器的位置等。

关系到现代高压灭菌器能否成功灭菌的一个主要问题是多孔负载物中的空气。空气可能是供应蒸汽中的污染物,使理论上在特定蒸汽压力下可以达到的温度达不到,或负载物中存在的空气会导致达不到所需的蒸汽接触,从而达到预期灭菌效果。

设计纯蒸汽发生器是为了提供高质量的蒸汽。健康技术备忘录(HTM)2010(一份英国文件)公布了它的标准^[15]。但是如空气、氮气等非凝结气体可能由于较差的隔离或内陷的蒸汽分布系统而在蒸汽中累积。因此,在临近使用时需定期进行验证。用于多孔负载物灭菌的高压灭菌器要采用某种方法除去空气。最常用的是在引入蒸汽前重复抽成高真空。这种做法去除空气的效果很难用物理方法监控。空气滞留可能是局部现象,一般在负载物的特定部位,在某些特殊材料(如在药液筒过滤器等)中或物品与物品相接触的地方(如瓶子的橡胶塞等)。所以,使用微生物指示剂来确保理论和实际一致是正常的。蒸汽灭菌的生物验证,尽管广泛地进行,还是很复杂的,从某种角度来说,知之甚少。最基本的原则是,一个合适的生物指示剂必须耐蒸汽灭菌(但又未必是已知的最具抵抗力的微生

物——嗜热芽孢杆菌的芽孢)。这已得到 USP、PhEur 以及其他国家的批准,并且是目前最常用的。生物验证周期的热致死率必须要低于正常生产周期规范所允许的最低热致死率。Halls^[16]和 Agalloco 及其同事^[17]发表了有关蒸汽灭菌生物验证的综述。

蒸汽灭菌并不一定要在高压灭菌器中进行。生产设备中的很多部分,包括大量的容器、管道、过滤器等,可以用蒸汽进行原位灭菌(SIP)。设备必须能耐受压力,可以抽去空气以及凝结物不会在系统的最低点累积。生物验证一般不是很复杂,通常通过确保操作程序能灭活几个具有生物学意义的试样。每个试样上会有 10^6 个嗜热芽孢杆菌(不规定 D_{121} 值但假定符合药典标准—— $\geq 1.5\text{min}$)的芽孢,并放在关键的位置。从学术上来说,将此做法等同于成组物品灭菌的无菌保证水平概念是有问题的。

必须严格监控蒸汽灭菌过程,看其是否满足温度、压力 and 时间的严格规定。使用生物指示剂的常规监测不是必需的。蒸汽灭菌设备的任何部件,如果运行不规则以致需要用生物指示剂进行常规监测,必须进行更换。

3.2 过滤灭菌

过滤是一种液体灭菌方法,它是将微生物除去而不是将其杀死。液体灭菌广泛用于无菌生产。气体灭菌既用于最终灭菌,也用于无菌生产。绝大部分过滤灭菌采用纤维素酯、聚偏氟乙烯、聚四氟乙烯、尼龙以及其他聚合材料。液体经过过滤器除去微生物的机制是很复杂的。过筛或表面滞留只是许多机制中的一种,这取决于膜的化学和表面特性、微生物以及悬浮液体之间的相互作用^[18]。

FDA^[10]对过滤灭菌器的定义是指那些孔径尺寸为 $0.22\mu\text{m}$ 或更小的滤器,并将其与使用缺陷短波单胞菌的微生物粒子通过试验相关:

“在测试缺陷短波单胞菌时,每平方厘米表面至少有 10^7 微生物截留于滤膜而得到无菌流出液的过滤器称为过滤灭菌器。”

在开发新型过滤灭菌器时,需要进行微生物粒子通过试验。由于它的专业化强,这项测试只能由过滤器生产厂家来做。然后,生产厂家提供第二次物理测试的限度(如起泡点、压力衰减、顺流等)。这些可以用于确认孔径的尺寸和薄膜过滤器的完整性。

4. 产品放行后的无菌保证

只有将无菌产品保存在微生物无法渗透的材料所制成的容器中,才能保证其无菌状态且不受周围非无菌环境的影响。

无菌产品的容器及密封体系必须能够承受加工、储藏以及运输条件的影响而保持无菌。FDA 最近强调了这一点,忽视了以前在为新无菌产品设立的稳定性试验程序中提供“无菌试验”数据的义务,这些试验是为了证实容器-密封体系的微生物学完整性^[19]。

目前对证实容器-密封体系的完整性还没有任何标准的

方法。注射药物协会在 1992 年^[20]与 FDA 在 1998 年^[21]出版的一些文件,有助于通过第二次物理测试来确定微生物学完整性,但这些文件并没有具体列出微生物试验的方法。

有两种通用的方法:湿法试验和悬浮微粒试验。湿法试验是测试液体中悬浮的微生物能否穿透密封的容器,容器内事先装入无菌的培养基。这样做的基本假设是微生物穿透填充液体的容器最可能的渠道是在容器内外之间形成的连续液体薄膜或“桥梁”。与湿法试验相比,悬浮微粒试验则不太重要。它只适用于二级屏障确保密闭体系内不存在任何水分的情况。

要全面讨论无菌保证,就不能不提多剂量眼用制剂。正常情况下,无菌注射用产品是单剂量或多剂量。多剂量采用无菌的传输装置(如注射器、给药器具等),而且只用于一个患者。眼用软膏和滴剂的情况有所不同。眼用制剂很少是单剂量,除非在医院,如眼科手术之后。

就眼科产品而言,多剂量的包装形式是常见的。包装容器在第一次使用时就必须打开,这样就很难保证以后使用期间的微生物学完整性。患者可能不定期使用,直到该产品的失效期。在这种情况下,药品可能或必然会发生微生物污染。必须将抑菌剂或防腐剂加入处方控制污染微生物的增殖。这些产品一旦打开,即不再是无菌产品。既然是这样,为什么还是要将眼用软膏或滴剂作为无菌产品来生产呢?对这个问题没有一个明确的答案。这是一种特殊情况。“有史以来”,各国都要求将眼用制剂作为无菌产品生产。要争论它的必然性或一致性是没有什么意义的。另一个特殊情况可能是 FDA1997 年的一个提议^[25],要求所有水性吸入剂也必须是无菌的。这个例子极其反常,因为只有非常特殊的情况下,才使用装置保证吸入剂无菌。即便是这样,患者的鼻咽或气管通道也是无法做到无菌的。

5. 热原、脂多糖和细菌内毒素

由于存在感染的风险,注射剂一般是无菌的。另一个关键的生物学特性是注射剂应该是没有热原的。热原是这样一种物质,当以足够量注射到人体内,会引起多种极度不良的症状,其中最易识别的是体温的上升。在极端条件下,体温上升可以是非常迅速的,以致患者死亡(内毒素休克)。在药典中,致热产品按惯例由家兔注射后引起的体温上升确定。

致热反应的致病因子是脂多糖。该物质来源于微生物,虽然所有的细菌都能够产生脂多糖,但脂多糖主要发现于革兰氏阴性菌的细胞被膜。天然产生的脂多糖是指细菌内毒素。

细菌内毒素与马蹄形鲎阿米巴细胞含有的可凝结蛋白的反应具有高度特异性。这促进了药品和其他物质细菌内毒素体外试验的发展。药典逐渐用体外鲎阿米巴细胞溶解产物(LAL)试验替代以前的注射剂家兔体内热原试验。目前市场上有各种试验系统(胶凝法、浊度分析法、发色法等),但是药典将胶凝法作为参考试验。在 LAL 试验的胶凝法中,一定量确定灵敏度(λ)的 LAL 试剂,如



0.03EU (内毒素单位)/mL, 与等量待测产品 (或其稀释物) 混合。混合物培养一定时间后倒置。产生凝胶, 证明样品中存在一定浓度的细菌内毒素, 其浓度等于或大于 LAL 试剂的灵敏度。

产品内毒素限量取决于由 K/M 推出的剂量范围^[22], 其中 K 是指任何物质在人体内引起热原反应的剂量域。除了某些例外, K 是一个固定值, 为 5EU/kg (患者体重), 计算时标准成人体重为 70kg。M 是每小时每千克患者体重的内毒素最大量。

因此, 内毒素限量对于每种剂型都是唯一的。因为 K 是固定的, 通常只需由产品说明书标明的最大人体剂量测定 M 。

内毒素试验的性能和验证需要密切关注应用控制标准。USP85 部分规定了这些详细要求, 与 PhEur2. 6. 14 部分一致。

细菌内毒素控制

虽然细菌内毒素来源于细菌, 但它们不会因为细菌的灭活而消失。在无菌注射剂生产通常使用的灭菌程序中 (见上文), 只有干热灭菌在适当的时间内能够破坏细菌内毒素^[23]。没有从成品中除去细菌内毒素的切实可行方法。因此, 必须从根源上加以控制。

细菌内毒素最可能的来源是水和与水接触过的产品接触包装材料。这是因为细菌内毒素往往与革兰氏阴性菌有关, 而革兰氏阴性菌主要是通过水传播的。

无菌注射剂生产中所使用的水必须符合药典的内毒素限量, 即不大于 0.25EU/mL (USP 和 PhEur 中注射用水的限量)。基本上, 符合该限量的水可由蒸馏、反渗透和超滤法生产。PhEur 只允许蒸馏法用于注射产品组分水的生产; USP 允许蒸馏法和反渗透法 (虽然反渗透很少在美国使用, 可能是由于 FDA 的压力)。只有日本药典允许使用超滤法生产注射用水。

接触产品的包装材料, 如玻璃瓶等, 必须是无菌的, 通常用干热灭菌法灭菌和除热原。FDA 对于可接受的除热原过程所需的标准^[10]是该过程应该能够以 10^{-3} (3log) 因子减少细菌内毒素。但是, 通过干热灭菌灭活细菌内毒素是复杂的, 满意的程序规范是很难预测的。纯脂多糖的灭活接近伪二级反应动力学^[24]。可能存在 160~170℃ 的温度域值, 低于该温度, 不管灭菌时间多长, 都不能以 3log 因子减少细菌内毒素。

非无菌产品的微生物控制

非无菌剂型包括多种产品。非无菌产品对患者的微生物风险也是多方面的。单一的微生物标准不可能合理应用于所有的非无菌产品。这一点无论是药典还是其他法规要求都有明确反映。同样, 在非无菌产品生产过程中的微生物控制和污染预防, 也没有单一的标准。

1. 微生物限度试验

USP 各论规定了一些而不是全部的非无菌剂型产品的微生物限度标准。PhEur 则采用了略微不同的方法。第 5. 1. 4 部分根据给药途径, 规定了两大类非无菌药品的微生物限度标准。其中一类产品是用于局部和呼吸给药的, 另一类是用于口服和直肠给药的。USP 第 61 章和 PhEur 第 V. 2. 1. 8 部分根据这些标准规定了微生物限度试验方法的指导原则。

在对特定的非无菌产品制定合理的限度时, 两种药典都考虑到了微生物对不同产品、产品的给药途径以及对患者的潜在危害的重要性。比如说, USP24 口服制剂中规定微生物限度的 48 条专论中有 47 条是关于肠道致病菌限度的 [如大肠杆菌和 (或) 沙门氏菌等]。其实口服制剂中也许不只是存在这两种微生物。而这两种微生物之所以被选择作为更广泛类型的指示剂是因为它们已有很具体的检测方法, 而且很容易在培养中被识别。同样, USP 有代表性地 (非普遍地) 限制局部给药产品中那些有可能造成皮肤感染的微生物 (金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌)。USP24 中的 68 条专论中有 67 条要求至少不能含有这两种微生物, 而且 67 条中的 11 条还有附加的要求。根据给药途径规定不可含有特殊指示性微生物的限制还必须符合普通的卫生标准, 即要求每克或每微升的微生物数量不能超过一定的指标 (通常是每克或每微升不得超过 100cfu)。PhEur 也采用了非常相似的方法。

药典对批量测试非无菌产品使其符合微生物限度的样本大小并没有的要求。测试对产品而言是破坏性的, 并且各地不可能都使用统计学有效的取样设计。分别从 10 个独立包装的 15g 药膏中取 1g 或者分别从三个独立包装的 500mL 糖浆中取 3.3mL 作为样品进行测试, 是比较典型的。

微生物限度试验, 与无菌试验一样, 都是为了达到确证的目的, 并且通常不对每批非无菌产品强制进行微生物限度试验。但是在美国, 每批非无菌产品必须强制进行试验。在 2001 年初, FDA 建议对以后注册的药品放松这一规定。然而, 由于片剂注册时没有微生物限度的要求, 试验不是强制性的。这么做的理由是因为片剂中所含的水分太少以致微生物污染物不能进行增殖。

应该注意的是, 主要的法规部门 (FDA、MCA) 并不希望药典限制微生物的数目, 可看作是容许污染微生物在非无菌产品中增殖。而目前接受这些限制只不过是承认现实, 即当药品不是作为无菌产品生产时, 存在某些微生物污染是不可避免的。处方设计很好的非无菌产品在微生物控制条件良好的情况下生产, 是不可能超过药典的微生物限度的 (通常是每克或每毫升 100cfu)。目前, 大多数管理机构都希望生产厂家在通用标准的基础上对非无菌产品设立更为严格的微生物限度。这些标准可看作是微生物超标时暗示微生物控制减少的预警限度。

2. 在非无菌药品生产中的微生物学 GMP

非无菌制剂生产需要进行微生物控制的程度主要取决于以下两个因素：患者感染造成的后果和产品中微生物增殖的可能性。

非无菌制剂给患者造成感染的严重性主要取决于剂型的给药途径。而污染微生物在非无菌制剂中生存和增殖的概率一般取决于其水分的含量。记住了这两点后，我们可以把非无菌制剂微生物控制的程度根据“星级酒店”的方法来分类，请见表 1。“星级”的精确分配只是一种主观看法。但在一种极端的情况下，毫无疑问水性吸入剂的生产需要“五星”级的微生物控制，也许不久就被要求无菌^[25]。而在另一种极端情况下，FDA 对固体口服剂型则不需要控制微生物限度。

表 1 依据微生物控制的需要进行无菌生产分类

给药的途径	无菌剂型的类型		固体剂型
	水性液体	非水性液体	
吸入给药	☆☆☆☆☆	☆☆☆☆☆	☆☆☆☆☆
鼻腔、口腔给药	☆☆☆☆	☆☆☆☆	☆☆☆☆
局部给药	☆☆☆☆	☆☆	☆☆
口服给药	☆☆☆	☆	☆
直肠给药	☆☆	☆	☆

目前，非无菌生产的微生物控制还没有发布指导原则。设备和设施的设计应该尽量减少与空气、人员和水的接触。

无论是环境中的气体或来自用于运行生产设备的空气压机的空气和流动床烘干机中的空气等，要避开空气是不可能的。即便是“一星”级的非无菌生产，生产和分装区的空气也应经过过滤。HEPA 过滤器应该用于“五星”级的非无菌生产，但一般不用于“一星”级的生产。处于中间级别的生产，则依据合理的风险评估选择空气过滤器。

药物生产的所有区域，除了必须的人员外，应限制其他人员的进入。为防止操作人员造成的污染，需要进行卫生培训以及执行卫生条例和穿保护性的衣服。头发是人员造成污染的主要来源，“便服”则是第二个主要来源。在非无菌生产的所有区域，操作人员都必须恰当地戴好发罩，胡须及其他过多的面部毛发都应掩盖上。袖套必须到手腕，而且应有松紧带缝口或有袖扣以符合要求。所有工作人员都应穿上提供的防护型鞋套或戴上鞋罩才允许进入药品生产场所。

水通常是非无菌产品的一个主要成分。当水作为一种成分使用时，必须要达到药典对净化水的要求，即每毫升不超过 100cfu 微生物。一个设计和运行良好的药品净化水生产及其输送系统要达到这个要求是很容易的。水是用来清洗设备和设施的主要液体，因此也是不可避免要碰到的。水是污染的主要来源，因为水当中有足够的养分使得各种微生物得以生存，特别是铜绿假单胞菌。

当水处于静止状态时，铜绿假单胞菌不仅能生存，而且可以大量繁殖。设备上（特别是缝隙中）、地板上、阴沟中或冲洗地带不允许有任何静滞水。污染会通过表面、有关人员的手或衣服上形成薄膜的水传播。水中的污染物可以通过振动或当水下落超过几个厘米时雾化。

要限制来自水的污染，应该在设备排水口和通向污水排水口的储水桶之间安装大约 5cm 的空气空隙。

FDA 公布了水系统设计和控制的要求^[26]。

3. 非无菌产品放行后的微生物质量保证

当产品放行后，可能会存在少量的微生物。这些微生物可能在数量上有所增加，达到给患者造成感染或“毁坏”产品的危险程度，这是不想见到的。

到患者开始服用或医疗专业人员使用该产品之前，另一种可能的污染是它的包装。非无菌产品的包装不需要特别的设计和试验来防止微生物的渗透。但是，很多产品在保护其活性成分的稳定性之后，还给予了很好的微生物防护。例如，用铝箔个别包装，就能防止微生物污染直到使用时。微生物污染压力定量吸入剂容器的可能性是很小的。

防止对多剂量包装产品（如气雾剂、鼻喷雾剂、口服液、药膏及洗液等）的微生物污染更加复杂。这些药品一旦打开，就很容易受到微生物的污染。如果它们是水质的，这些“新”污染物一般很容易增殖。为避免这一点，必须加入抗菌成分或防腐剂，并且要符合药典中规定的防腐效率标准。防腐效率试验（还未统一）在 USP 的第 51 章及在 PhEur 的第 VII. 14 部分都有说明（图 3）。

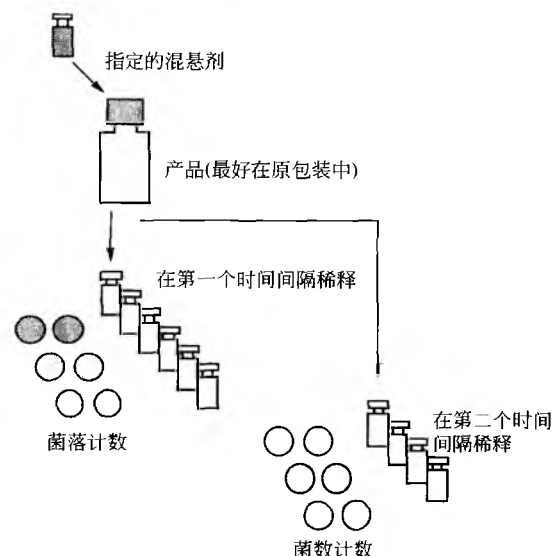


图 3 防腐效率试验的示意图

参考文献

1. Knudsen, L. F. Sample Size of Parenteral Solutions for Sterility Testing. J. Am. Pharmaceutical Assoc. 1949, 38, 332—337.

2. Brewer, J. H. Sterility Tests and Methods for Assuring Sterility. Antiseptics, Disinfectants, Fungicides and Chemical and Physical Sterilization; Reddish, G. F., Ed.; Henry Kimpton; London, NC, 1957.
3. Bathgate, H.; Lazzari, D.; Cameron, H.; McKay, D. The Incubation Period in Sterility Testing. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1993, 47 (5) .
4. Brewer J. H. Schmitt R. F. Special Problems in the Sterility Testing of Disposable Medical Devices. Annual General Meeting of the Parenteral Drug Association; New York, November, 2, 1966.
5. Commonwealth Department of Health, Standard for Sterile Therapeutic Goods; Therapeutic Goods Order No. 11, Australian Government Publishing Service; Canberra, 1984.
6. Bernuzzi, M.; Halls, N. A.; Raggi, P. Application of Statistical Models to Action Limits for Media Fill Trails. Eur. J. Parenteral Sci. 1997, 2 (1), 3—11.
7. Pharmaceutical Drug Association. Technical Report No 22. Process Simulation Testing for Aseptically Filled Products; Pharmaceutical Drug Association Inc.; Bethesda, MD, 1996.
8. McCulloch, E. C. Disinfection and Sterilization; Lea and Febiger; New York, 1945.
9. Medicines Control Agency. Rules and Guidance for Pharmaceutical Manufacturers and Distributors; The Stationery Office; London, 1997.
10. Food and Drug Administration. Guideline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing; FDA; Rockville, MD, 1987.
11. Aseptic Processing of Health Care Products. 1. General Requirements; IS 13408 — 1, International Standards Organization; 1997.
12. ISPE Baseline Pharmaceutical Engineering Guide. Sterile Manufacturing Facilities; ISPE; 1998; 3.
13. Cleanrooms and Associated Controlled Environments I. Classification of Air Cleanliness; II. Specifications for Testing and Monitoring to Probe Continued Compliance with ISO 14644—1; III. Metrology and Test Methods. BS EN ISO 14644—1, 2, 3; , 1999.
14. Airborne Particulate Cleanliness Classes in Cleanrooms and Clean Zones; Federal Standard 209E. Federal Supply Service, General Services Administration; Washington, DC, 1998.
15. Sterilization. III. Validation and Verification; The Stationery Office; London, 1994; Health Technical Memorandum 2010.
16. Halls, N. A. Resistance “Creep” of Biological Indicators. Sterilization of Medical Products; Morrissey, R. F., Kowalski, J. B., Eds.; Polysciences Publications, Inc.; Champlain, NY, 1998.
17. Agalloco, J. P.; Akers, J. E.; Madsen, R. E. Moist Heat Sterilization-Myths and Realities. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1998, 52 (6), 346—350.
18. Meltzer, T. H. Filtration in the Pharmaceutical Industry; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1987.
19. Food and Drug Administration. Guidance for Industry, Container-Closure Systems for Packaging Human Drugs and Biologics; FDA Center for Drugs and Biologics; Rockville, MD, 1999.
20. The Prevention and Detection of Leaks in Ampoules, Vials and other Parenteral Containers Parenteral Society Technical Monograph No. 3; Parenteral Society; Swindon, UK, 1992.
21. Pharmaceutical Package Integrity; Technical Report No. 27 PDA; Bethesda, MD, 1998.
22. Weary, M. E. Understanding and Setting Endotoxin Limits. J. Parenteral Sci. Technol. 1990, 44, 16—17.
23. Ludwig, A. D.; Avis, K. E. Dry Heat Inactivation of Endotoxin on the Surface of Glass. J. Parenteral Sci. Technol. 1990, 44, 4—12.
24. Tsuji, K.; Harrison, S. J. Dry Heat Destruction of Lipopolysaccharide; Design and Construction of Dry Heat Destruction Apparatus. Appl. Environ. Microbiol. 1978, 36, 710.
25. Federal Register. September 23, 1997, 62 (184) .
26. Food and Drug Administration Guide to Inspections of High Purity Water Systems; FDA; Rockville, MI, 1993.

(鲍 英 译)



药品的质量保证

Barbara K. Immel

Immel Resources LLC, Petaluma, California, U. S. A.

不管你能做什么或梦想做什么，开始做。勇敢中包含着天赋、能力和魔力。

——歌德

引言

药品质量保证（QA）的本质是保护患者以及确保其在服用某公司生产的药品时的安全性。产品品质的定义就是它符合质量标准，适合潜在的用途，满足客户的要求。在美国和全球的管理工业的法规中都要求有有效的质量保证部门（QAU），质量保证必须独立于其他部门，能完全地履行职责，在没有干预或利益冲突下在公司内部建立权威。质量保证通过建立必要的系统、程序和现场控制来完成它的使命，并加以持续改进。

职责

QA 的主要职责包括审核和测价操作，批准产品和文件质量（这里的批准指的是放行或拒绝），管理变更控制、问题调查和产品召回等。QA 特定的任务会因以下情况而不同，或是与依照 GLP 进行产品研发共事，或是与遵循 GMP 规范生产临床样品或市售药品共事，或是与遵循 GCP 规范的医学监视员、主要研究者、机构审核委员会或合同研究机构（CRO）共事。

QA 主要起到预防性作用，其目的是建立良好的体系、标准操作程序（SOP）和准备其他所需要的文件，以便持续生产出合格的产品，防止问题或错误的发生，仅对符合标准的产品、原材料、研究及报告进行放行。符合标准的产品由于生产过程中出现一些令人不满意的情况，仍可能被拒绝放行（如环境监测偏移或其他也可能影响产品安全性和纯度的事件）。

在解答产品质量问题或法规行为时，质量保证也起到了积极作用。QA 必须有书面的召回程序和体系（严格按 21 CFR 7），这样才能快速同各部门员工商议，包括法规、研发、临床试验、制造、质量控制、公共或投资者事务和法律咨询部门，以决定事实和采取最佳的措施（和纠正行为），包括需要时快速开始产品召回。在讨论依照法规 QA 特定的角色和责任前，让我们回顾药品开发的整个过程或生命周期。

产品研发简介

在最近的 PhRMA 研究中，研发单一药物从产品设想

到上市所需的平均费用和所耗的时间估计分别为 500 万美元和 15 年^[1]，一些投资银行公司甚至估计成本会更高。制药工业有一些特点，一是制药工业创造的产品是用来治愈疾病、减少疼痛和痛苦，改善生活质量和寻找对疾病的治疗；二是这个行业是被高度管制的。显然，为要立足商业，一个公司必须有利可图，或者在一些业务中维持收入。James Tingstad，一位已退休的很有名望的 *Pharmaceutical Technology* 专栏作家，在他最新出版的 *Good Technical Management Practices* 一书中说，在我们这个行业中，患者永远是第一位的。由于他或她是患病的，其次才是职工和股东。显然，这涉及一个非常复杂的平衡——患者需求和职工、股东和投资者需求的平衡。

伴随着一个设想的产生，在产品研究和开发阶段对一种潜在的新产品进行评估。一些研究（动物毒理学或安全性研究）必须在 GLP 条件下执行。如果安全性数据是好的，再决定进一步开发该产品，提交研究用新药申请（IND），以便在提交后 30 天内开始人体临床试验。

在临床试验中，用于患者的所有物料必须遵照 GMP 生产，GMP 的约束力是连续的，在临床阶段 GMP 的要求略宽，后续阶段会更紧。临床药品的无菌状态，也就是防止污染或交叉污染的风险的需求，必须在进入人体临床试验前确实保证。

临床医生或其他参与试验人员必须遵循另一套规则，称之为 GCP。典型的药品或生物产品有 3~4 个主要的临床试验阶段：第 I 期、第 II 期和第 III 期（第 IV 期是上市后的研究）。如果患者的数据被证实是有希望的，且药品经证实同时具备了安全性和有效性，则可提出新药申请（NDA）。

在美国，一种新药品在批准上市前，有两项主要步骤必须进行。第一步是技术或科学审评，审评者有的来自 FDA，有的是外聘的顾问专家委员会，他们的审评技术和临床数据用以确定产品的安全性和有效性。作为审评的一部分，FDA 的调查员将被派往公司的生产和研究现场去进行批准前检查（PAI）或发证前检查（PLI），检查数据的真实性，检查在临床样品的研发和制造中是否遵循适用的规则，检查在商业化生产中的设施是否符合 GMP。在批准前，准备生产商业化产品的场所必须通过 PAI 或者 PLI。

如果技术或医学审评和检查结果都是可接受的，第二步是批准上市。在药品的整个生命周期都需要坚持 GMP。通常，公司将选择开始另外的临床实验以研究这个化合物

的新适应证,或依据 FDA 的要求完成另外的测试。这些试验都必须按 GCP 的要求进行(图 1)。

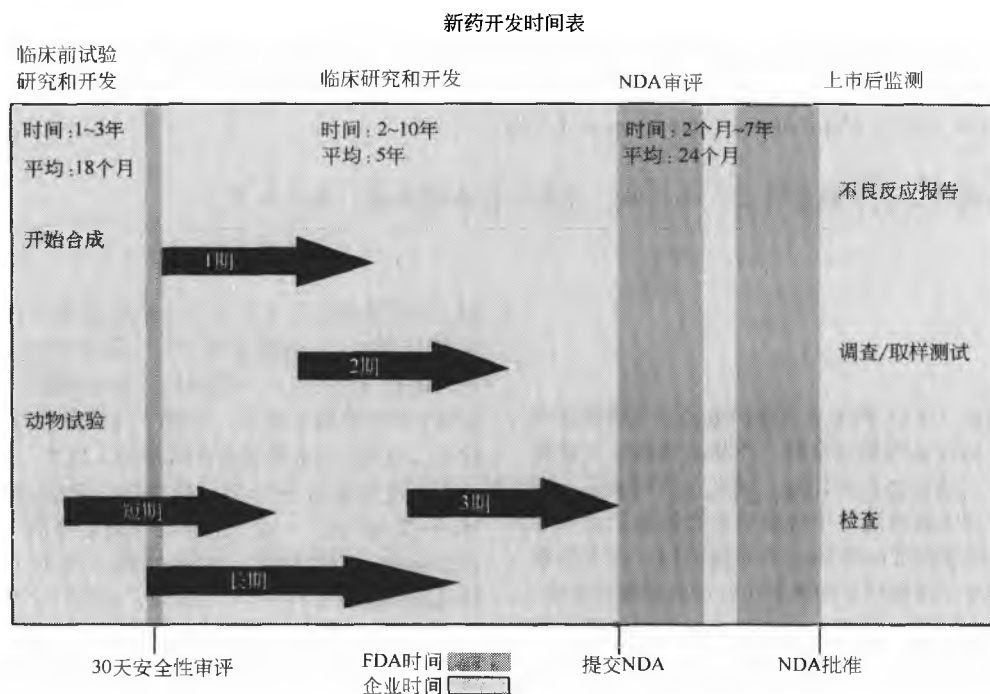


图 1 新药研发时间表

GLP

在美国, GLP 规范 (21 CFR 58) 适用于研发阶段安全性或动物毒性的研究, 该规范定义了非临床试验研究的 GLP 要求, 非临床试验研究是支持或旨在支持 FDA 管制产品的上市许可的申请, 包括食品和色素添加剂、饲料添加剂、人和兽用药、人用医疗器械、生物制品和电子产品。

符合这部分要求的目的是确保提交的安全性数据的质量和完整^[2]。

优良实验室管理规范要求建立 QAU 来监督每一项研究都符合法规。GLP 也规定 QAU 必须完全分离, 独立于研究人员之外^[2]。

QAU 的法规要求包括:

- 保持所有非临床实验研究的主表格的副本, 以实验项目为索引, 包括了实验方法、研究性质、开始研究的日期、每一项研究的目前状态、承办者的身份和研究负责人的名字;
- 保持该部门负责的全部非临床实验的所有方案副本;
- 定期检查每一个非临床实验以确保研究的完整性;
- 保持每次定期检查有书面的和适当标识的记录, 显示检查时间、被检查的研究项目, 检查研究的阶段、参与检查的人员、结论和问题、建议采取的行动、已采取的行动和再检查的预定时间;
- 任何发现的有可能影响研究完整性的问题应直接引起研究负责人和管理者的注意;

• 定期向管理者和研究负责人书面报告每一个研究项目的状态, 注明任何问题和采取的纠正措施;

• 决定在没有适当授权和文件形式规定下, 已批准的方案或 SOP 没有产生偏差;

• 审阅最终的研究报告以保证报告准确描述了方法和 SOP, 保证报告结果准确反映了原始数据;

• 准备和签署一份说明附在最终报告中, 说明按期进行了检查, 并向管理者和研究负责人汇报了发现的问题^[2]。

另外, 在每一版的 GLP 法规中, QAU 的责任和程序, 所有应保留的记录, 类似记录的检索方法都必须书面记录并保存。需要的记录包括内部审核(检查)日期、被检查的研究项目、被检查的研究项目所处阶段、审核人员名字。该信息和所有书面程序的副本在 FDA 检查员要求时应能出示。根据要求, 设施测试管理也必须提供书面的证书给 FDA, 以证明内审已经贯彻、执行、记录和遵循^[2]。

在美国之外, 经济合作与发展组织 (OECD) 颁布了已被它的成员国和欧盟采用的 GLP 规范, 这些 GLP 规范应用于化学品的测试, 以获取关系到人类健康和环境的性质和(或)安全性信息。日本健康福利部 (MHW) 也颁布了适用于非临床试验安全性研究的 GLP 规范, 这些研究是根据国家药品事务法规, 用来支持申请生产或进口药品或申请重新评价新药^[3]。

一个好消息是协调努力正在进行中, 基本的 GLP 原则是类似的。然而, 差别是存在的。主要的差别包括方案和最终报告中特定内容的要求, 记录、样品和试验物的保存时间^[3]。制造商必须熟悉关系到他们产品的 GLP 规范, 意

识到他们的数据将递交到世界上哪一个法规机构,了解生产和评价的产品关系到哪一个立法^[4]。

1. 缺陷避免

在 GLP 中重复出现的问题主要是文件、培训、对外包实验室的管理和获得必要的管理支持。一位有名的 FDA 检查员和国家 GLP 专家近期声明,最普遍的问题是缺少质量保证部门的支持,包括:

- 将 QAU 的责任委派给经验不足的员工(如某人具有商业学位但缺少实验室经验);
- 不按规定培训(如担任此工作的员工能按照程序执行,但不知道如何去培训);
- 误用标准复印件将方案和报告合在一起,而没有校对文件;
- 未能对计算机操作系统进行验证;
- 管理者认为使用电脑时,所需的最终报告和方案的审核可以简化;
- QA 的支持不存在或简化。

检查员会询问哪种花费较少:使用一或两位额外的 QA 员工,或由于不遵循 GLP 进行操作而不能使用该研究或注册申请。

有经验的 FDA 检查员所报告的其他 GLP 问题包括:

- GLP 研究和基础研究在同一实验室,没有明确的划分;
- 研究发起人和合同方之间缺少协调;
- SOP 过期,不能反映目前的程序;
- 员工不能按照 SOP 操作,或不知道 SOP, SOP 与员工之间处于无关状况;
- QA 审阅或研究方案和 SOP 不充分;
- 缺少仪器、计算机和软件的安装和(或)验证文件;
- 试剂和实验品过期;
- 未能将动物隔离(如老鼠、猪养在一起);
- 记录和样品存放不当一缺少标签和鉴别;
- 未记录 GLP 培训(特别是对于辅助人员)^[5]。

优良实验室规范的建立,对所有的工作技能、测试方法和使用的仪器系统进行培训和再培训是关键的,由一位非常值得尊敬的人员提供培训是很重要的。良好的记录习惯也是成功提交注册和专利保护的基础,实验室记录的要点在下一节中列出。

2. 25 条实验室记录要点

(1) 使用永久的、不褪色的墨水记录,书写应清晰易读。记住阅读者不仅是你或你的主管,还有公司法规部和 QA 人员、患者律师、FDA 和其他法规机构的调查员,他们有可能在你记录若干年后来调阅你的数据。记录并提供所有物料的使用量。

(2) 对于开发性或可申请专利的工作,应当清楚而详尽地阐明对象、目的和每一个实验的结果。

(3) 记录所有的操作细节和条件,包括产量、产品或

化合物名称、标准和参照物批号、供应商和任一物料的产品有效期。

(4) 使用科学的方法,减少科学变量至 1 个,达到最佳的重现性、准确性和精密度。

(5) 建立和使用认可的方法。只要有可能,就使用法定方法。验证非法定方法。尽力考虑采纳这些建议,使得能重现你的实验结果。

(6) 参考任一方法、标准、色谱数据和图表。包括任一受控文件的文件号、有效日期和修订号。

(7) 每一页都必须由实验者和记录者签名和标明日期。

(8) 将图表等永久地粘贴在记录纸上。当展开时,粘贴的文件应在打开的记录页范围之内。

(9) 研究数据必须尽快经过复核、签名和标明日期,或者由第三方证明(签名和标明日期,并注明“已阅,并已理解”)。

(10) 如果首字母签名已录入档案,且这种做法在公司记录 SOP 中用书面规定允许,那么用首字母来代替签名是可接受的。

(11) 避免负面的或外来的评论。不要发表意见,保持客观性。

(12) 对于开发的产品,第三方证人必须具有技术能力能够证实所做的工作,但也必须既不持有设想也不参与到由其他职工执行的工作中。

(13) 每天的工作必须开始记录在单独的一页上,上一页未使用的部分用对角线划去。

(14) 监督或检查人员应在任一页未使用的对角线处签名。

(15) 如果工作继续记录在下一页上,这页开始应有一句话“接上页……”,每页都必须标明记录日期。

(16) 不得在粘贴的纸下面记录,任何内容不得覆盖。

(17) 插入内容应由登录和复核人员签名和记录日期,或由另一人证明。

(18) 如果数据没保存在笔记本上,他们必须提供与相关实验记录有关的参考以进行核对、签名、标明日期和鉴别。

(19) 实验记录本在没有检查员或 QA 经理的认同和批准时,不得复印。

(20) 任一记录本在领用时,都必须指定一个唯一的号码,当它归还公司档案室时重新编号。

(21) 实验记录本是保密的,是公司的财产。完成的记录本不得存放在研究者或分析者的工作区域。填满的记录本必须归档在公司的档案室以便于适当保存。知识产权是企业的生命血液,每一个公司应对档案管理和实验记录本的回收建立系统。要选择一个中心位置,且有防水防火的保障,应强制进行文件的归档,包括要求离职的员工在离开公司前交出他们的实验记录本。

(22) 每个公司应建立实验记录本管理制度和记录保存时限。

(23) 所有的职工必须进行培训记录程序和程序的修



订,并有书面记录。

(24) 花时间将信息罗列在表格中,列出所有实验和所记录的所有页码,以便当公司整理提交或准备 FDA 检查时,这些信息能很容易获得。

(25) 引用记录本内容时,要包括分析者或研究人员的首字母、笔记本号和笔记本页码^[4]。

GMP

1978 年美国针对药品制定的 GMP 规范 (21 CFR 210/211) 是各国最早颁布的 GMP 规范之一, GMP 规范能够确保所有药品的安全性和有效性。

法规包含了药品生产、加工、包装或储存中使用的方法、设施或控制的现行生产质量管理规范的最低标准,以保证该药品符合法规对安全性的要求,具有所宣称或拥有的药物、剂量、质量及纯度等特征^[10]。

QA 的职责在 GMP 中称为“QC 部门”,法规规定了 QC 部门必须具备的职责,联邦法典 21CFR 210 和 211 除了部分适用于制剂产品的生产外,还可以作为活性药物成分 (API) 或生物原料药生产的参考。

- 批准或拒收所有组分、药品包装容器、密封件、中间体、包装材料、标签及药品;

- 复查生产记录,保证不产生差错,若发生差错,保证能够得到充分调查;

- 根据合同,批准或拒收由其他公司生产、加工、包装或储存的药品;

- 拥有适当的实验室检验设备,批准(或拒收)各种成分、药品容器、密封件、包装材料及药品;

- 批准或驳回影响药品的定性、效价或含量、质量及纯度的所有程序或规格标准。

与 GLP 一样, QC 部门的职责和程序必须用书面方式规定,并遵照执行^[10]。对于制剂的 GMP 规范要求修改的内容已在许多企业使用,包括审阅和批准验证方案,评估在产品、工艺、设备或其他方面的变更,以决定是否要进行重新验证^[11]。

主要的职责包括了审核和操作的评估。质量保证必须独立地评估,并告知质量管理的高级管理者,使得他们的操作、供应商和合作者遵循标准操作程序、物料标准、公司标准和不断调整的需求。质量保证部通常管理或指导内部的、公司的、管理机构的审核,并陪同审核员,除非公司有独立的部门来执行此项功能(无论哪个部门担负此责任,职责必须写入标准操作程序中,并遵照执行)。

质量保证部也有批准或拒绝产品质量或批处置的职责,处置决定是 QA 专业人员将履行的最艰巨工作之一(参见作出 QA 决定)。批处置(无论批准还是拒绝)只有在审阅了全部适用记录后方可决定。批评估经常是由有经验的 QA 专业人员或经理来完成,低级别的职工或顾问从不履行此职责,尽管在美国的法规中并未禁止后者(在欧盟,只有具有必备经验和指定公司生产或销售授权的“有资格的人”

才能放行各批次药品,这个要求适用于在欧盟放行或销售的各批次药品)。

为履行他们审阅和放行的职责, QA 必须审阅程序、方法、取样计划、测定方法、内部和外部标准的适应性,批准标准操作程序、标准、方法、验证计划和结果及相关文件。QC 部门也必须批准原材料、各成分、设施(包括内部的和供应商及合作者的设施)、中间体及制剂药品。

只要有允许生产部门或其他部门去执行所需要的检查和测试的程序,那么程序和行为的和结果就应接受 QA 周期性的审核或检查,这种监督可能包括 QA 检查和平行或取代生产部门的测试。

质量保证部门必须批准每一批投放市场的产品、用于临床实验的产品、用于支持注册的产品和(或)用于支持工艺验证的产品。

单纯的实验批号不需要 QA 的批准,所有的批准必须基于在批产品放行之前, QA 完整审阅了设施、程序、方法、记录、检查和测试结果,这适用于内部生产的产品和外包产品。

最后, QA 也负责管理变更控制、问题调查和产品召回。QA 必须审阅和批准变更标准操作程序,确保 QA 在考虑所提出的变更对质量的影响及法规符合性的基础之上,完成批准变更行为。

质量保证部必须批准问题调查标准操作程序,评估调查,批准措施,确保采取纠正和预防行为。QA 必须对任一需要召回已售产品或类似情况进行确认并做出决定。召回是 QA 所面临的最严峻的情形之一,召回所需考虑的内容在这篇文章的后面会提到。

一般来说, QA 负责人的机构地位不低于生产负责人,为将利益冲突减到最小, QA 负责人对生产、包装、采购、生产计划、工程或资产控制不具有日常职责。为 QA 决定积累数据的小组,比如实验室、检查小组,通常汇报给 QA,但也可以汇报给非生产部门,如研发部门。日常执行原材料、中间体和制成品检验的 QC 实验室不是生产支持系统^[18]。

1. 主要任务

在生产临床和商业化产品中 QA 小组的一般任务包括:

- 控制文件和记录保存;
- 批记录(每批生产的“处方”)分发和审阅;
- 批评估(批准或拒绝);
- 内部审计;
- 审核注册文件(可以帮助编写);
- 变更控制;
- 问题调查(包括偏差、不符合、产量差异、超限结果等);
- 客户投诉;
- 年度产品审计(审核每个市售产品的所有批次);
- 环境检测和控制;
- 培训;



- 稳定性研究计划;
- 样品保存时限;
- 取样;
- 验证;
- 处理质量危机;
- 做出召回决定;
- 陪同外部检查, 对管理机构或商业检查报告作出反应;

- QC 实验室——完成所有检测^[18]。

2. QA 作出决定

当审核产品和质量问题的严重性时, 当是否决定放行产品时, 应考虑以下问题^[15]。请注意, 当出现环境检测或其他严重偏移时, 即使批产品符合质量标准, 也需要拒绝放行。

- 产品是否符合标准?
- 它的适应证是什么, 产品用于什么患者: 心脏病患者? 免疫性疾病患者? 儿童或老年患者。(请注意召回的关键原因是是否产品有缺陷, 而不是产品的适应证)。
- 产品是什么剂型, 以什么方式使用? (注射剂是要求最高的剂型之一, 因为它们的成分能很快到达血液)。
- 问题的严重程度, 所涉及的风险是什么? 是否有污染的可能? 如果有, 生物体和它可能的来源是什么? 当制剂产品使用时, 污染物对人体有什么作用?
- 环境监测数据如何? 样品是否通过无菌检测 (环境监测的结果, 包括操作者的表面接触平板、设施的 EM 数据、空气、水和仪器, 比并不能确保无菌的无菌检测更重要, 请注意环境监测数据对生物制品原料药也非常重要)?
- 产品应该放行吗? 你会服用这批产品中的药品吗? 你是否会给你的孩子服用?
- 最后, 有哪些其他产品或批号受影响? 同样的仪器、空气、房间、物料或塞子对于别的产品或批号有用吗? 寻找“连锁反应”: 其他产品可能同样被影响, 如果被影响或被怀疑, 那必须进行彻底调查。

3. 在召回会议中需考虑的项目

这些信息^[6]并未包括所有的一切。请咨询你们公司的 QA 经理、法律顾问、质量顾问团, 召回程序或在 (美国) 联邦法典 (21 CFR 7) 中对召回处理的特殊法律要求。

确定问题的范围

- 什么产品, 什么适应证?
- 多少数量或批次?
- 何时何地销售?
- 有其他产品或剂型受影响吗?
- 你是什么时候及怎样发现该问题的?
- 内部发现或测定结果? 如有, 提供详细资料。
- 外部发现? 如有, 提供最初投诉的详细资料, 名字、电话和住址。

- 纠正措施采取了么?

- 投诉有任何回复吗?

确定问题的原因

- 如果不知道, 问题的起因是什么?
- 是怎样进行调查的?
- 需要多久确定原因?
- 产品是不符合标准吗? 产品或装置正用于治疗或诊断吗?

- 是否产品或装置与报道的事故或不良反应有关系?

召回分类

对患者的危害:

- 有生命威胁吗?
- 产品适应证和患者例数?
- 过失或召回的严重性?

召回操作

- 通知销售人——发票确认;
- 如果生命有威胁, 将所有产品取回并销毁, 记录销毁, 确保可追溯;
- 如果有一些数量被影响, 电话通知, 再寄信函;
- 对于电话工作要有书面稿, 确保员工按书面稿执行, 使得他们不会泄密;
- 如果是销售代表安装产品 (例如装置或器具), 要将它们召回;
- 在发表前, 要有一封由律师审阅过的召回信, 这封信应简洁地告诉收信人一些必要的信息, 明显确认这是一封召回信函;
- 按照召回的标准操作程序, 计划对召回效果进行检查;
- 通报 FDA 当地机构 (如果产品允许销往美国以外, 通报世界各地管理机构);
- 确定问题涉及的产品和范围 (所有批或部分);
- 如果知道, 那是什么原因 (如果不知道, 查找原因);
- 召回的分类和风险是什么;
- 需要 72h 预警吗, 医疗器械报告 (MDR)? 生物产品过失和意外报告;
- 计划如何去指导召回, 所有受影响的批号 [和 (或) 产品] 都确认了吗。

最后一点非常重要, 就是避免做了一项召回, 然后几天或几周后再做另一项召回。这种行为也会使得管理机构无论是对控制情况, 还是召回能力都感觉不舒服。

4. 需避免的缺陷

根据 FDA 药品评价和研究中心 (管理药品的分支机构) 官员信息, 最近的 GMP 问题包括^[16]:

- 缺少工艺和计算机验证;
- 超标结果未充分调查;
- 缺乏对伤害投诉的调查;
- 由于不恰当的设备清洗导致的交叉污染, 尤其是原

料药;

- 缺少对无菌工艺的完整验证;
- 无菌操作者缺乏实践;
- 环境监测不充分;
- 分析方法未验证;
- 员工培训不足;
- 未能证实用于稳定性实验的分析方法能表明产品稳定性。

在预批准检查中 GMP 警告信和缺陷发生的常见原因包括实验室控制、生产和工艺、记录报告和验证 (清洁、工艺、含量和计算机)^[17]。

虽然基本原则是相同的,但是每个国家都有自己的 GMP。欧盟的 GMP 定义药品 QA 是具有广泛的概念,覆盖了影响产品质量个人或集体的所有事物。它是确保医药用品质量符合其潜在用途的组织机构的总和^[13]。美国 FDA 被广泛认为是世界最严格的管理机构之一,其他机构,如医学控制机构 (MCA)、伦敦的欧盟药品评估机构 (EMA)、BfArM (德国机构)、加拿大的健康防护部门 (HPB)、日本卫生部也是被认为相当严格的。(在美国)一般的看法是:如果你符合国际协调会议指南 (ICH) 和美国法规,将很有可能符合其他各国的法规。

GCP

优良的临床规范是人用药临床实验的法规。在美国,对于这门学科的法规包括以下几项:

- 21 CFR 50: 人的保护;
- 21 CFR 56: 机构审核委员会;
- 21 CFR 312: IND.;
- 21 CFR 314: NDA.;
- 21 CFR 320: 生物利用度和生物等效性的要求。

欧盟成员国对在欧盟的药品实验遵循优良的临床规范,研究药品的生产,参照欧盟的优良制造规范。日本的 MHW 也出版了 GCP 规范。然而,ICH 是个体工作联盟旨在对欧盟、日本、美国建立统一标准,整合后的 GCP 指南变成了指导临床实验的统一标准,指南的建立参照了欧盟、日本、美国、澳大利亚、加拿大、北欧国家和世界卫生组织的现行 GCP^[6]。

ICH 指南定义 QA 为:为确保实验进行和数据产生、记录和报告都符合 GCP 和所适用管理要求所建立的有计划的活动。质量控制,被定义为:在质量保证系统内所采取的操作技术和活动,以证明与试验相关的活动都符合质量要求^[6]。

指定给公司申办者 QA/QC 小组的特定职责描述如下:

- 申办者负责按照书面 SOP 执行并维持质量保证和质量控制体系,保证试验的实施和数据的产生、记录和报告都符合试验方案、GCP 以及适用的管理要求;
- 申办者有责任保护各有关方面的协议,保证申办者以检查和稽查为目的的直接访问各有关试验单位、源数据/

文件、报告,以及保证国内外管理当局的视察;

- 在数据处理的每一阶段都应当有质量控制,以保证所有的数据是可靠的,并已经得到正确的处理;
- 申办者和研究者/研究机构以及参加临床试验的其他方应当订书面协议,协议可以是方案的一部分,也可以为单独的协议。

指南也要求申办者确保所有临床试验的样品都是在 GMP 条件下生产的,在临床中,在 GMP 或 GLP 中通常由 QA 承担的责任 (如选择、检查或稽查、培训等) 可以由临床研究合作者 (CRA)、医学监察员或合同研究单位成员来履行。

临床领域变化很快,临床专业人员必须适应。欧盟、美国、日本和 ICH 的要求有很大差异,特别是组织和细节,尽管四国 (或地区) 法规都说明了主要的内容。任何一家公司希望在任一国家做人体临床试验时必须符合所有适用的法规。在这篇文章发表的时候,一家公司希望在日本上市产品,就要在日本做临床试验 (尽管采用的是 ICH 指南),这还是必要条件。由于美国参与基因治疗试验的年轻人近期的死亡,临床试验加强了审查和执行。在美国, GCP 和 GLP 符合性的检查称为“生物研究学监察”检查。

有经验的 FDA 检查员在临床调查中报告的问题包括方案违反、记录保存不全、未能在试验开始前完成知情同意书、报告不良事件和药物说明 (记录保存的详细目录)。

在 IBR (欧洲的伦理委员会,审阅和批准在本机构做的研究、临床方案、交叉手册等的小组) 检查中再次由有经验的 FDA 检查员提出的问题包括:

- 缺少书面程序;
- 缺少成员的资质要求;
- 知情同意不充分;
- 在缺少人数的情况下批准研究;
- 记录保存不全,特别是笔记;
- 紧急情况批准不恰当;
- 加速批准不恰当;
- 研究的持续性评估不充分^[5]。

临床试验申办者、他们的监察员,和 (或) 他们委派

的合同研究机构的职责为:

- 需要时,在研究开始之前获得 FDA 或世界其他管理机构的批准 (一些研究需要准备 IND 文件;在获得 IRB 或伦理委员会批准后,有时简单的研究可以开始);

- 合适地生产和标签试验用药品;
- 需要时,开始、继续或中断临床研究;
- 试验用药品不能商业化;
- 试验用药品的控制发放和收回;
- 选择有资质的调查员管理研究;
- 给研究者传达合适的信息;
- 评价和报告不利情况;
- 保持足够的研究记录;
- 充分监察临床研究者^[5]。

申办者可以将他们的有关责任转移给有经验的、有名

的合同研究机构。但根据法规,这样的转移要有书面的协议。未在书面协议中指定的职能不能转移,申办者或他们的合同研究机构的有效监督是在临床中防止欺骗的关键。监督或稽查通常由 QA 或对申办者承担该角色的人员来执行^[5]。

将来的趋势

近期的 PhRMA 调查显示,1980~1997 年,QA/QC 和生产部门的职工人数减少了 10 000 人——减少了 11.7%,然而药品研发和市场人员成倍增长^[2]。这些统计数据和 GLP、GMP、GCP 泛滥的警告信和其他美国 FDA 对公司采取的调整性行为,存在某种关系吗?

由于工作外包,自动化程度提高,兼并,规模减小,工厂合并,QA/QC 职工越来越少。或许,为了推动产品上市和降低成本,制造商正由于在某些方面人员不足、不能提供足够的培训和监督,从而使用临时雇员和优选操作,最终伤害了自己^[4]。

可是,在美国违反法规和严重质量问题的后果依赖于问题的严重性和持续时间,当然,所导致最恶劣的结果就是患者将受到伤害。

对于不符合法规要求的美国法规包括了采用完整性政策(对假药)、严格的检查、警告信、进口警告、暂停研究和(或)产品批准、取消政府合同、产品的召回、查封、永久禁令的法令、民事货币处罚、暂停或撤回执照和起诉(包括控告和暂时或永久的剥夺,如有犯罪)^[5]。

显然,不仅应把患者放在首位,还要符合所有适用的法规,这符合每一家公司自身的利益。在过去不久的那段时间,我们已经看到了非常昂贵的民事货币处罚,最贵的是因 6 年内重复违反 GMP 而受到的 1 亿美元的处罚^[13]。当迈入 21 世纪后,我们承诺做正确的事,将患者放在首位,投资必要的资源、体系和改革,不仅为了确保患者的安全,而且为了持续改进我们的操作,与全球的法规变更同步,满足法规的最低要求。任一企业可通过以下措施拥有有效的 QA 体系:

- 建立有意义、有用的体系;
- 持续的改进;
- 拥有好的,和(或)有经验的 QA/QC 专业人员;
- 有足够的职工人数;
- 给职工发言权;
- 争取高级管理者的支持;
- 进行彻底的问题调查以确定问题的根源;
- 符合目前所有适用的法规和规则的规则;
- 与同行联络,保持工业实践的同步;
- 同时支持符合性和商业改进;
- 培训和发展员工;
- 与管理机构、研究者和调查员的问题同步^[6]。

没有有效的质量体系和持续地不符合法规机构的要求或期望,很有可能会产生严重后果,我们都有责任去减小

风险,像服务于我们公司一样,服务于患者^[6]。

1. 法规时间表

纯粹食品和药品法 建立首个政府管理机构(现在大家所知道的 FDA);25 年游说的结果是,这项法案使得在销售食品或药品中“掺入次品”或“贴错标签”成为违法。

联邦食品、药品和化妆品法典 悲剧:磺胺酞剂中的有毒溶剂造成 107 人死亡。结果:要求制造商在产品上市前证明其安全性。

两个不相关的事件 **胰岛素修正案**要求 FDA 测定和保证胰岛素的纯度和含量,悲剧:因销售了被镇静安眠剂污染的磺胺噻唑片而导致 300 人死亡和受害。结果:FDA 彻底修改了生产和质量控制规范,这也是日后 GMP 的开始。

1962: **Kefauver-Harris 药品修正案** 悲剧:沙利度胺,一种安眠药片和用于治疗早孕反应,在欧洲导致了数千名婴儿出生缺陷;结果:在产品上市之前,制造商必须证实产品的有效性,确保药品测试中的严格控制。

1978: **对药品 cGMP 最终法规** (21 CFR 210/211) 建立了对药品生产、加工、包装或储存中现行的最低限度的生产质量管理规范。

1979: **GLP (21 CFR 58) 最终法规** 建立了指导非临床实验研究的 GLP 规范,非临床实验研究是支持应用研究或人用药、兽用药,人用医疗器械和生物制品上市许可。

1982: **对 OTC 产品的保险包装** 悲剧:被氰化物污染的对乙酰氨基酚胶囊造成了 7 人死亡,结果:修改的 GMP 规范要求使用保险包装。

1983: **两个不相干的法规事件** 在药品加工中计算机系统检查的指南开始对计算机和计算机验证严加控制。联邦反贿赂法使得用包装的消费产品贿赂变成了联邦犯罪。

1987: **工艺验证的一般原则指南** FDA 对工艺验证的要求列出了要点。

1992: **非专利药的强制法** 涉及简略 NDA 的违法行为促成的。结果:对所有药品申请建立了违反罚款和开始了 PAL。

1996: **两个不相干的事件** 对药品和生物制剂的美国 cGMP (21 CFR 210/211) 提议的修改稿增加了验证、混合均匀性、防止交叉污染和超标处理的详细内容;ICH 对工业的指南: E6, GCP; ICH 整理后的指南成为指导人临床试验的统一标准。

1997: **电子记录最终规则** (21 CFR 11) 需要控制以确保所有电子数据的安全性和完整性。

1998: **起草指南** 药品生产的制造、加工或储存原料药和超标调查。

2. 定义和其他有用的信息

以下定义摘自美国 FDA 强制执行的法律和规范要求^[9]。

联邦食品、药品和化妆品法定义药品为“用于诊断、治愈、缓解、治疗或预防人或其他动物疾病的物品”,“这

种物品（不同于食品）用于影响人或其他动物的组织或某一功能”。确定某物品是否为药品是它的潜在用途。这样，当食品和化妆品宣称有治疗作用时，也要满足药品的法律要求。联邦食品、药品和化妆品法禁止任一药品掺假或贴错标签，要求“新药”在上市前由 FDA 进行审评和批准。

掺假 意味着被污物或腐烂物污染。多年之后，这个定义延伸到未遵循 GMP 生产的产品。

贴错标签 是指伪造的或令人误解的标签上的说明、设计或图案，也指标签未能提供需要的信息。

通常药品申请分为三种：新药申请（NDA），新的动物用药申请（NADA），对非专利药的简略新药申请（ANDA）。

违反了必要的法规或执行禁令的任何犯罪个人会被处以 250 000 美元的罚款，触犯禁令的犯罪企业或合伙人会被处以 100 万美元的罚款。

参 考 文 献

1. PhRMA Industry Profile 1998; Pharmaceutical Research and Manufacturers of America; Washington, DC, 1998.
2. General: Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies. Code of Federal Regulations, Food and Drugs; revised April 2000; Title 21, Part 58 U. S. Printing Office; Washington, DC.
3. DeWoskin, Robert S.; Taulbee, Stephanie M. International GLPs; Interpharm Press; Buffalo Grove, IL, 1993.
4. Immel, Barbara K. The forgotten GLPs. Pharmaceutical Technology Analytical Laboratory Supplement, February 1999; Advanstar Communications; Eugene, OR, 1999.
5. Anderson, Carl. One FDA investigator's view. UC Berkeley Extension Drug Development Course, San Francisco, CA, Fall 1999.
6. Immel Barbara K. , When things go wrong; Part 1: The consequences of noncompliance. BioPharm, August 2000; Advanstar Communications; Eugene, OR, 2000.
7. International conference on harmonization, guide for industry: E6, good clinical practice—Consolidated, Guidance, Geneva, Switzerland, April 1996. Published in the Federal Register 9 May 1997, 62 (90), 25691-25709, www.fda.gov/cder/guidance/959fnl.pdf.
8. Maynard, Donald E.; Dent, Nigel J.; Yoshida, Hideo; Dewoskin, Robert S. International Good Clinical Practice: The GCP Compliance Handbook; Interpharm Press; Buffalo Grove, IL, 1996.
9. Requirements of Laws and Regulations Enforced by the U. S. Food and Drug Administration; FDA; Rockville, MD, revised 1997. Available at www.fda.gov/opacom/morechoices/smallbusiness/blubook.htm.
10. Current good manufacturing practice in manufacturing, processing, packing, or holding of drugs. Code of Federal Regulations, Food and Drugs; revised April 2000; Title 21, Part 210/211. U. S. Printing Office; Washington, DC.
11. 21 CFR parts 210 and 211 current good manufacturing practice; Amendment of certain requirements for finished pharmaceuticals; proposed rule. Federal Register; 3 May U. S. Food and Drug Administration, 1996.
12. Guide to good manufacturing practice for medicinal products for human and veterinary use and annexes. The Rules Governing Medical Products in the European Community; June European Commission; Brussels, Belgium, 1991.
13. Lewis, C. Investigator's reports: Manufacturing misdeeds cost abbot record-breaking payments. FDA Consumer 2000, 34 (3), May-June Available at www.fda.gov/fdac/departs/2000/300_irs.html.
14. Immel, Barbara K. A brief history of the GMPs: The power of storytelling. BioPharm, August 2000; Advanstar Communications; Eugene, OR, 2000.
15. Barbara K. , Immel. Step up to the responsibility of QA and QC. BioPharm February 2000; Advanstar Communications; Eugene, OR, 2000.
16. Famulare, Joseph. In Compliance Update, 24th Annual GMP Conference, Athens, GA, March 2000.
17. Falcone, Marie. FDA Inspection Trends, WorldPharm Conference, Philadelphia, PA, September 1998.
18. Immel, Barbara K. The essence of quality assurance. UC Berkeley Extension Course on Drug Development, San Francisco, CA, Spring 2000.

（傅 民 译）



药品及药物系统中的表面活性剂

Owen I. Corrigan

Anne Marie Healy

University of Dublin, Trinity College, Dublin, Ireland

引言

表面活性剂是一种可以低浓度吸附在系统的表面或界面上,使表面/界面自由能或表面/界面张力发生改变的物质。表面活性剂具有特征性结构,同一分子中既有极性(亲水)基团也有非极性(疏水)基团,因此表面活性剂就具有两亲性质。本章介绍了有关表面活性剂在药品和药物系统中的广泛应用。

理化背景

1. 表面/界面张力及表面/界面自由能

表面/界面和相内部的同种原子和分子拥有大不相同的界面能。“表面”通常指凝聚相(如液体和固体)和气相或真空的区域,“界面”通常指两凝聚相之间的区域。

在气液表面,液体分子只能与其下方或旁边的分子产生内聚力作用,而与气相分子产生黏附力作用。然而,在气液表面,这种黏附力很小。两种力作用的净结果就是液体表面的分子比液体内部的同种分子具有更高的势能,受到指向液体内部的力的作用。这个力将表面分子凝聚在一起并使表面收缩。

这样,液体表面就像是处在拉紧的状态下,而这个在液体表面向各个方向拉紧的力称为表面张力(γ)。

为了扩展液体表面,有必要对抗向内的拉力将内部分子带到液体表面,增加单位面积所需的功称为表面自由能。

在两凝聚相的界面上,靠近界面的毗邻层内的两相不同分子具有比两相内部各自相同的分子更高的势能。这是由于相同分子间的内聚力比不同分子间的黏附力大的缘故。这样界面张力就是存在于两种不混溶的或部分混溶的凝聚相界面单位长度上的力,界面自由能就是增加界面单位面积所需的功。

2. 吸附现象

吸附可以定义为一种或多种物质在某表面富集的过程^[1],或者一种物质在另一表面被吸收的过程^[2]。吸附可以发生在任何类型的界面,然而,在药物系统的环境中,表面吸附很重要的界面是气-液、液-液、气-固、固-液界面。

2.1 液-液和气-液界面的吸附

在两种不相混溶的系统(如庚烷和水)中,吸附在两

液体界面上的表面活性剂分子会定向排列,将亲水端朝向极性大的液体(水),疏水端朝向极性小的液体(庚烷)。这样,表面活性剂分子取代了原来表面的水和(或)庚烷。如此,界面上的相互作用力就是表面活性剂的亲水基团和界面一侧水相分子的作用,以及表面活性剂的疏水基团和界面另一侧庚烷分子的作用。这些相互作用比原来不相同的水分子和庚烷分子间的作用力强很多;因此界面上吸附的表面活性剂显著降低了界面张力(即两相界面上向内的拉力降低了)。

空气中的分子大都是非极性的。表面活性剂降低气-液界面张力是由于它们吸附在界面上,亲水端朝向液体。表面活性剂降低了朝向液体内部的净作用力,也因此降低了表面张力。

表面活性剂对降低表面张力的作用如图1所示。即使是在表面活性剂浓度很低的情况下,仍能降低表面张力。随着表面活性剂浓度的增加,表面层被表面活性剂分子饱和,在液体内部形成疏水基团向内的胶束,表面张力趋向于恒定值。胶束是表面活性剂形成的疏水基团向内的微小凝聚体。表面活性剂刚开始形成胶束的浓度称为临界胶束浓度(CMC)。

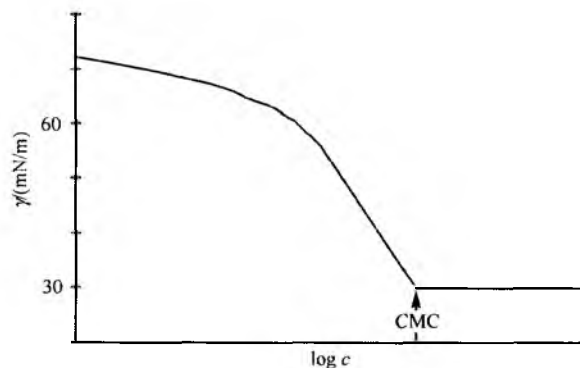


图1 表面/界面张力(γ)与表面活性剂浓度(c)的对数的示意图

2.2 固-液界面的吸附

表面活性剂从水溶液吸附到固体表面的过程涉及特定的表面活性剂(吸附质)和表面(吸附剂)的化学作用。常见的相互作用包括^[3]:离子交换;离子对相互作用;酸碱相互作用,包括吸附质和吸附剂间的氢键作用或路易斯酸碱反应; π 电子极化作用吸附,其中,被吸附物含有富电子芳香核,而吸附剂带有强正电荷位点;色散力引起的

吸附,如吸附质和吸附剂的伦敦-范德华色散力;疏水键合作用。

3. 接触角和固体润湿

当一滴液体滴在平整均一的固体表面时,平衡后,形成使系统总自由能最低的形状。此时固-液夹角称为接触角 θ ,接触角可以通过液滴测量(图2)。如果表面和界面张

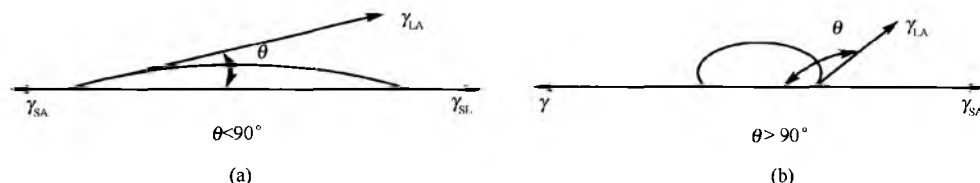


图2 (a)的接触角 $\theta < 90^\circ$,固体可以润湿;(b)的接触角 $\theta > 90^\circ$,固体不被润湿

式中: γ_{LA} 是液体界面张力; γ_{SL} 是固-液界面间的表面张力; γ_{SA} 是固体表面张力(或表面自由能);如果 $\theta < 90^\circ$,固体可以润湿;如果 $\theta > 90^\circ$,固体不被润湿。“润湿”指一个流体的表面被其他流体占据,常发生在液体或固体表面的气体被水或水溶液取代时。“润湿剂”是指任何能增加水或水溶液取代固体或液体表面空气能力的物质。

润湿良好时, $\cos\theta$ 尽可能接近1,即 θ 尽可能接近0。从杨氏方程可以看到,如果 γ_{LA} 或 γ_{SL} 减小, $\cos\theta$ 将增大,润湿将得到改善。

水对粉末的接触角对药学研究有着十分重要的意义,常通过将粉末压制或熔成圆片来测量。但压制会改变表面性质,会使测量结果有微小误差。因此可以将粉末装填在管里并通过测量液体的渗透来测定细粉的接触角。

润湿现象有三种^[4]:吸附润湿、铺展润湿和浸没润湿。

特定体系的润湿行为取决于固体物质和相互接触的液体的界面能,以及液体和另一种流体(如空气)的界面能。通过改变这些参数可以控制润湿过程,使用表面活性剂可达到这一效果。

表面活性剂对润湿过程的影响是由于它们吸附在不同的界面从而改变了界面张力的结果。如杨氏方程显示,如果 γ_{LA} 或 γ_{SL} 减小,或两者都减小而 γ_{SA} 不变,润湿将改善。表面活性剂通常会引起 γ_{LA} 降低,但对 γ_{SL} 就不一定有同样的效果,表面活性剂对界面张力的影响也取决于吸附的性质。所以在体系中添加表面活性剂并不总能提高润湿,铺展就更困难了^[4]。

如果表面活性剂分子在固液界面以这样的方式排列:极性端朝向固体,疏水端朝向液体,水溶液的润湿性就会降低。如果表面吸附了离子或极性物质(离子交换或离子对机制),表面活性剂分子就会以上述方式排列。然而,如果表面活性剂浓度更高,表面活性剂分子通过疏水作用吸附在已经形成的吸附层上,将亲水端暴露于溶液中,表面就更容易被润湿。因此,接触角最初

力已知,接触角可通过方程(1)或(2)所示的杨氏方程计算:

$$\gamma_{SA} = \gamma_{SL} + \gamma_{LA} \cos\theta \quad (1)$$

或

$$\cos\theta = \frac{\gamma_{SA} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LA}} \quad (2)$$

会增大,随着更多的表面活性剂加入溶液中,接触角又减小。相反,非极性表面的吸附通过范德华作用力发生,表面活性剂分子将亲水基团朝向液体,物质的亲水性增加,变得更容易润湿。

表面活性剂在固体表面的吸附十分重要,尤其是对于表面活性剂的去污性质、在固体药物剂型中作为润湿剂的应用和在混悬剂处方中作为稳定剂的应用。这几种体系中表面活性剂的作用机制将在后面进一步讨论。

4. 胶束化

前面提到表面活性剂可以在水溶液中形成胶束。这些胶束是胶体大小的分子簇。胶束化代替界面吸附,避免疏水基团和水溶液接触,从而降低了系统的自由能。在胶束中,疏水基团朝向表面活性剂凝聚束的内部。如果疏水基团不能引起周围溶剂弯曲,就不容易形成胶束,同样,如果在水中表面活性剂的疏水基团很短或在非水溶剂中,都不会形成胶束。

胶束是动态的,胶束里的表面活性剂分子和溶液中的表面活性剂分子快速地以恒定速率相互交换。因此,尽管可以设想有平均胶束形状,但胶束并没有确定形状的刚性结构。

胶束有以下几种主要类型^[3]:①小球形;②拉长的圆柱形,具有半球端的棒状结构;③大的、层状胶束;④囊泡,或多或少的球状结构,由一层或多层层状胶束以同心圆形式构成。

在非水溶剂中,表面活性剂会形成“嵌入胶束”,即表面活性剂分子的亲水头部集中在胶束中央,而疏水链向外伸入溶剂中。偶极矩相互作用把表面活性剂分子头部集中在胶束核心中央,在一些情况下头部基团也会产生氢键相互作用。

温度和浓度的变化以及液相中电解质的添加都会影响胶束形状。这些因素中任何一个改变都会影响胶束大小、形状和聚集数(胶束中表面活性剂单体的个数)。

5. 表面活性剂的相行为

5.1 相平衡结构

随着表面活性剂溶液浓度的增加,会出现如图3所示的结构^[5]。浓度远超过CMC时,溶液排列得更有序,会出现两种主要的液晶相结构:中间相M,由相互平行的长棒成六角状排列;净相G,具有层状结构。液晶六角相,如同胶束相一样,会表现出正常或相反的取向。随着溶液浓度增加,形成的相结构通常遵循特定的次序(图4),“镜面”穿过层相,使得人们将“水包油”作为正相,“油包水”作为反相^[5]。

5.2 修饰的相结构

除了以上提到的相平衡结构外,还存在非平衡的表面活性剂相结构,并且在给药系统中也有应用。常将层状相表面活性剂分散在大量水中(或非水极性溶剂如乙二醇或二甲基酰胺中)形成囊泡,或分散在大量油中形成反相囊泡。对于大多数表面活性剂,囊泡为非平衡结构,最终还会重新平衡为最初形成的层状相结构。囊泡的结构与脂质体类似(稍候将讨论),大致为球状结构,对脂溶和水溶性试剂都有增溶作用。

表面活性剂产生的几种相结构可能作为药物载体和囊泡,也可以作为靶向系统,将药物直接输送到身体内的特定部位^[5]。

表面活性剂的分类

表面活性剂按分子内亲水基团的性质可以分为如下4类:

(1) 阴离子表面活性剂。亲水基团带负电,如 RCOO^- 、 RSO_3^- 或 ROSO_3^- 。药学中重要的例子有月桂酸钾 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}^- \text{K}^+$ 和十二烷基硫酸钠 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}^+$ 。

(2) 阳离子表面活性剂。亲水基团带正电荷(如卤化季铵 $\text{R}_4\text{N}^+\text{Cl}^-$)。药学中有重要应用的有:溴化十六烷基三甲基铵、十四(烷)基三甲基铵溴化物(68%)、十二烷基三甲基铵溴化物(22%)和十六烷基三甲基铵溴化物(7%)的混合物,及氯化苯甲铵,即通式为烷基卞基二甲氯化铵 $[\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{R}]\text{Cl}^-$ 的混合物,其中R代表 C_8H_{17} 到 $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ 的烷基。

(3) 两性表面活性剂(也称为两性离子表面活性剂)。分子内同时含有正电荷和负电荷,如硫代甜菜碱 $\text{RN}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ 。药学中的例子有N-十二烷基N,N-二甲双胍, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ 。

(4) 非离子表面活性剂。分子没有电荷但是通过高极性基团能增加水溶性,如羟基或聚氧乙烯。药学中的例子有聚氧乙烯乙二醇单醚(如cetomacrogol)、Span[®]和Tween[®]。

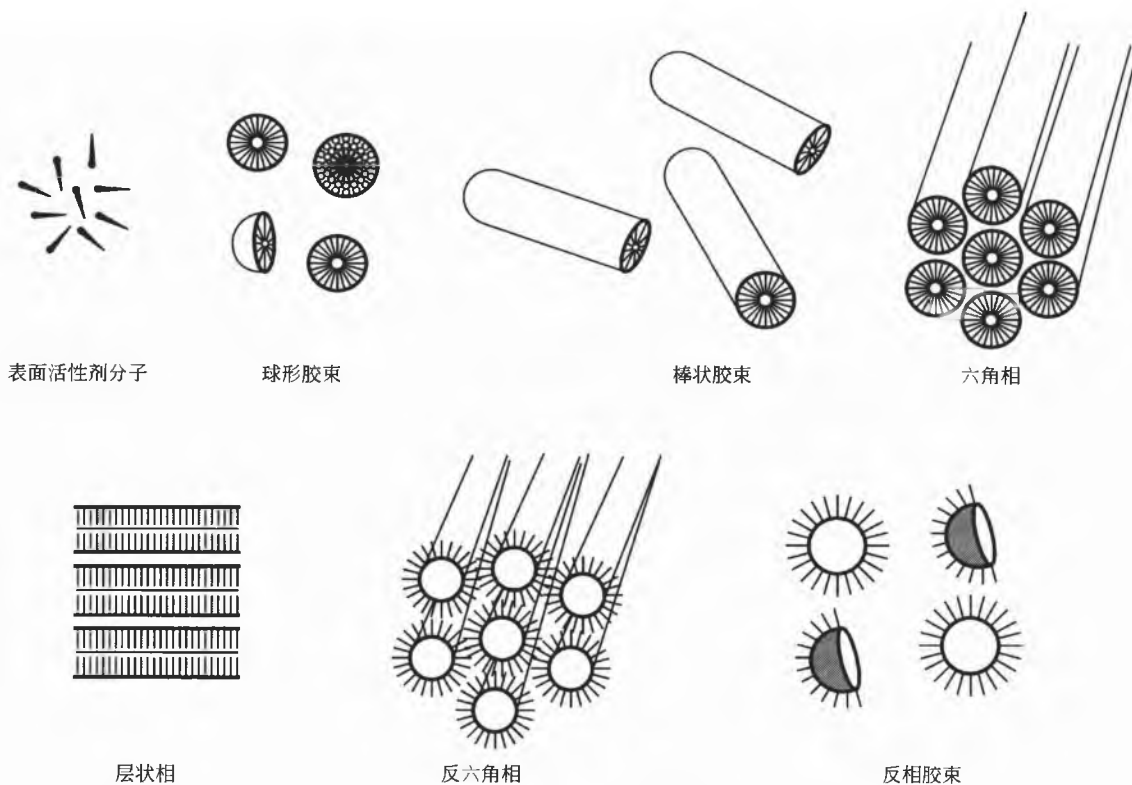


图3 表面活性剂分子的相平衡结构

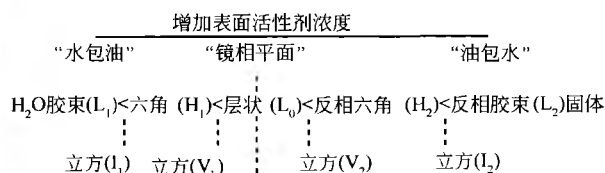


图4 理想的表面活性剂-水体系的相序列

本书原著第一版第14卷《表面活性剂在药品及其系统中的应用》^[6]—文中表1~表4以及引用的文献中列举了药领域常用的表面活性剂及其用途。

药物制剂中的表面活性剂

由于表面活性剂具有独特的功能性质，因而在药物制剂中有广泛的应用。根据产品的不同，这些应用包括：改善药物在液体制剂中的溶解度和稳定性，改善半固体制剂的稳定性和质地，或者改变颗粒的流动性，从而有助于片剂的压制过程。除了作为辅料改善处方的理化性质，表面活性剂也可以提高药物的功效及生物活性。表面活性剂的性质使其能够改变药品的热力学活度、溶解度、扩散性、崩解性和溶出速率。每个参数都会影响药物吸收的速度和程度。而且，表面活性剂对生物膜的吸收有直接的影响，会改变药物的跨膜转运。在处方中加入表面活性剂的总体影响很复杂，也许会超出预期目标。表面活性剂有可能会降低处方中抗微生物剂或防腐剂的效果^[7]，也有可能破坏生物膜。

液相体系

1. 溶液

1.1 表面活性剂作为增溶剂

增溶可定义为在给定溶剂中加入一种或多种两亲性组分，使原来在该溶剂中不溶或溶解度很小的化合物形成热力学稳定的各向同性的溶液^[4]。加入的两亲性组分（即表面活性剂）浓度应该大于等于临界胶束浓度。前面提到的简单胶束体系、反相胶束体系、液晶相和囊泡都具有增溶作用。在液晶相和囊泡体系中，加入增溶剂形成三元体系，这些各向异性的体系不能严格地符合于上述定义^[4]。

1.2 胶束增溶

胶束中增溶剂的位置主要取决于增溶剂的化学结构。增溶可发生在胶束中的不同部位：

- (1) 在表面和胶束-溶剂的界面上；
- (2) 在亲水性头基之间；
- (3) 在栅状层，如在亲水基团和形成胶束核外围疏水基团的少数碳原子之间；

(4) 栅状层的更深处；

(5) 在胶束核内部。

在水溶液中，非极性添加剂如碳氢化合物易于与胶束的非极性内核结合。极性或半极性物质，如脂肪酸和乙醇，常嵌入栅状层，渗透的深度取决于增溶剂分子中极性结构和非极性结构的比率。

在反相胶束（形成于含有表面活性剂的非极性溶剂体系）中，极性物质可在极性头基相互作用形成的内核中增溶。

增溶剂分子在胶束中最好的增溶位点是由化学结构决定的。然而，增溶体系是动态体系，增溶剂分子在胶束中的位点随时间快速变化。在高于临界胶束浓度的表面活性剂水溶液中的增溶作用，为难溶药处方制备提供了可行的方法^[7]。从定量的角度看，临界胶束浓度之上的增溶作用可认为是水相和胶束相的简单分配现象。因此表面活性剂浓度 C_m 和药物溶解度 C_{tot} 的关系如方程（3）所示：

$$C_{tot} = C_s + PC_s C_m \quad (3)$$

式中： C_s 是表面活性剂存在时药物的浓度； P 是药物在水相和胶束相的分配系数。 C_{tot} 和 C_m 呈线性关系，斜率为 PC_s ， PC_s 表示胶束的增溶能力^[8]。

改变囊泡的 pH，可以改变离子化药物的表观分配系数。因此，增加包裹酸性药物的囊泡的 pH 会降低药物在胶束相的分配。如果表面活性剂是弱电解质，就会导致浓度依赖的 pH 变化，而改变药物的分配和溶解度^[9]。

总之，具有相同碳氢链的表面活性剂的增溶能力依次为：阴离子表面活性剂 < 阳离子表面活性剂 < 非离子表面活性剂，原因是头基单位面积的增加会导致碳氢核密度降低，胶束更松弛，从而可以容纳更多的溶剂。

给定表面活性剂体系的增溶作用是两种组分理化性质的综合作用，这种作用反过来也影响药物结合至胶束的位点。表面活性剂的摩尔体积和它的亲脂性是增溶的重要影响因素，前者降低增溶，后者提高增溶^[9]。

许多药品包含的很多溶质都可以被胶束相增溶，不同溶质间的竞争导致增溶能力的变化。而且，第二种高增溶组分的加入形成的混合胶束体系，可以大大改变体系的结构、大小和增溶能力，因此显著增强药物的溶解度。

增溶在酚类防腐剂和消毒剂处方中已应用多年。在皂甲酚溶液以及对氯间二甲酚溶液中，肥皂胶束用来增溶酚类物质。肥皂（阴离子表面活性剂）由氢氧化钾和适当的油如亚麻油（皂甲酚溶液）和蓖麻油（对氯间二甲酚溶液）化学反应形成。表面活性剂溶液对疏水物的增溶能力在作为溶解胆结石的溶剂方面取得一定成功。

1.3 增溶体系中药物的稳定性

药物在胶束中的增溶会影响它的稳定性^[7]。在胶束中，药物分子的分子环境改变了它们相互间的位置和取向，从而影响活性。在胶束中，药物分子被保护而不与氢离子或氢氧根离子相互作用，稳定性增加。胶束中和本体溶液环境不同，分子从本体溶液中转入胶束中反应速率会显著



改变。胶束体系可用于改变化学反应的速率和方向^[7]。

1.4 AB 嵌段共聚物胶束

大家熟知嵌段共聚物在选择性溶剂（即对某段分子可溶，对其他段分子不溶的溶剂）中，通过不溶部分的聚集形成胶束^[10]。与低相对分子质量表面活性剂分子形成的胶束相比，嵌段共聚物胶束缓慢解聚成游离的聚合物链。它们对芳香分子有很强的增溶能力，显示出低临界胶束浓度。AB 嵌段共聚物胶束是疏水药物的良载体。

只有少数几种嵌段共聚物可以在水溶液中形成胶束结构。例如，聚氧乙烯/聚氧丙烯/聚氧乙炔共聚物，商品名普朗尼克，通用名泊洛沙姆。泊洛沙姆在药剂中有广泛的应用，尤其用于静脉注射乳剂^[7]。在低浓度时，泊洛沙姆在溶液中改变构象形成单分子胶束^[7]。在高浓度时，单分子胶束聚集。聚集束增溶药物，增加药物稳定性。泊洛沙姆毒性小，虽然多分子核壳结构的胶束在生理环境中能否形成还不确定，但其增溶能力已经在疏水药物的释放中得到确认^[11]。

其他嵌段共聚物用于制备疏水药物的辅料，例如，聚氧乙烯/聚天冬氨酸和聚氧乙烯/聚（ β -苯甲基-L-天冬氨酸）嵌段共聚物用于制备多柔比星。

2. 混悬剂

如果通过分散技术（与沉淀技术相反）制备混悬剂，可在处方中添加表面活性剂以增加固体颗粒的分散度。这在药物粉末不易被液体介质润湿时就显得十分重要。表面活性剂可以降低固体颗粒和液体溶剂之间的表面张力，减小接触角，增强润湿。这样的体系称为反絮凝体系。加入表面活性物质可以增强粉末的润湿，改善处方的生物利用度。

颗粒表面的力会影响混悬剂的絮凝和凝聚。分散在液体介质中的颗粒以一种或两种方式带电。溶液中的离子会吸附在混悬剂粒子表面，或者表面的电荷会引起吸附在表面的基团的离子化（如羧基）。表面电荷会影响固体颗粒周围的水性介质的离子分布。结果就会产生“双电层”。如果表面带正电，表面的邻近区域就会紧密结合溶剂分子和带负电的反离子。这样，第一层紧密结合，第二层（含有大量负离子）更加分散^[14]。当水溶液中两粒子接近时，产生大于双电层排斥力的弱吸引力。这个区域中粒子的相互作用称为絮凝。

絮凝颗粒为弱键合，快速沉降，不结成饼，易于再分散。由于这个原因，常需增强混悬剂的絮凝。

在处方中加入表面活性剂能达到“控制絮凝”的目的。表面活性剂通过一系列不同机制使颗粒分散^[3]。第一种是表面活性剂分子对颗粒表面反离子的静电相互作用，导致相邻两颗粒间电势能屏障降低。絮凝还可以通过桥连作用形成。在不同位点具有官能团的表面活性剂分子长链（常为多聚物）可以吸附在相邻颗粒的表面上，将颗粒以松驰的排列结合在一起。或者当表面活性剂分子以这种方式吸

附时，分子延伸入液相，表面活性剂分子伸入液相的部分吸附在不同颗粒表面的相互作用，导致颗粒的桥连。

使用表面活性剂形成絮凝的另外一种方法是首先用离子型表面活性剂处理颗粒以对它们进行分散。然后加入可溶性的电解质，使每个分子表面形成双电层，从而产生絮凝。接下来，这类体系的稀释将使其重新分散（因为电解质浓度的降低）

3. 乳剂

乳化作用是表面活性剂在药剂系统中最重要应用。这种现象已经被广泛研究，已有多数图书以及章节专门对这一主题进行了介绍。

大分子乳剂要么是水包油（o/w）的，要么是油包水（w/o）的。乳剂的类型主要取决于所使用的乳化剂种类，制备过程和水、油的相对比例就显得不是很重要了。总之，乳化剂在水相中溶解度大于在油相中的，形成 o/w 型乳剂；而在油相中溶解度大于在水相中的，形成 w/o 型乳剂。此外，还可以形成多相乳剂。例如，小水滴或小液滴可以包裹在油滴中，而这油滴又被分散在水相中。这种系统称为 w/o/w 型乳剂。同样也可以形成 o/w/o 型乳剂。

许多味道差或口感差的药物可以制成乳剂，使口服给药的依从性更好。矿物油基质的缓泻剂、油性维生素和高脂营养物质常制成 o/w 乳剂。一些研究数据表明，某些药物形成乳剂后吸收会增强^[15]。乳剂（o/w）常用作脂质营养物的静脉给药形式。硫酸钡乳剂被用作 X 射线诊断中的显影剂。

在药剂产品中常借助乳化作用制备外用制剂，如洗剂和软膏剂，在气雾剂中形成泡沫。以下讨论半固体乳化制剂。

乳剂按照分散颗粒或液滴的大小分为：

（1）大分子乳剂，液滴粒径约 0.1~50 μ m，不透明乳剂；

（2）小分子乳剂，液滴粒径约 10~100nm，透明分散。

一种液体在另一种不相溶的液体中稳定分散需要加入乳化剂，该乳化剂通常是一种或多种表面活性剂的混合物。

在乳剂形成的过程中，一种或两种液体分散在另一种不相溶的液体中形成液滴。这种分散大大增加了界面自由能，因为界面积增大了。乳化剂通过吸附在液液表面定向排列成膜而使乳剂稳定。这层膜降低了液体间的表面张力，也通过形成机械的、静止的和（或）电屏障使分散介质的聚结率降低。

一个较强的机械屏障减少了液滴在碰撞时聚结的机会。吸附的表面活性剂形成界面膜以较强的侧面相互作用紧密排列，机械稳定性最大。因此，常使用一种或多种表面活性剂作为乳化剂，如使用水溶性表面活性剂和油性表面活性剂的混合物。在药剂（o/w）系统中常用 Span[®] 和 Tween[®] 的混合物。水溶性 Tween[®] 易于和水相形成更强的作用，它的亲水基团比无氧乙烯化的酯在水相中延伸得更长。这可以增强分子中疏水基团的相互作用，因为它们可

以在界面膜中靠得更近。

由于界面膜使相近液滴间产生静电斥力,也能增强乳剂的稳定性。这种斥力由于液滴带电引起。表面电荷作用只有在 o/w 型乳剂中有重要影响。表面电荷的来源是表面活性剂的亲水性头部朝向水溶液中排列。在含有阳离子表面活性剂分子的乳剂中,分散相液滴上的电荷是两亲性离子产生的。在非离子表面活性剂中,电荷可以由液相离子吸附产生,或由液滴与水相的摩擦产生^[3]。在后者时,高介电常数的相带正电。

3.1 微乳

微乳由大的或“溶胀”的胶束组成,其含有与增溶溶液类似的分散相^[16]。和乳剂不同,它们是清澈、透明的溶液,比乳剂有更高的热力学稳定性,具有无限的稳定期,只要组成、温度和压力都不变。这和乳剂形成对比,乳剂虽然在长时间里稳定,但是最终会相分离以保持最小自由能。将形成乳剂的成分温和混合就可以制备微乳,而乳剂的形成需要剧烈搅拌,两者大不相同。制备微乳需要一种以上表面活性剂或使用混合表面活性剂和辅助表面活性(如具有中长链的极性化合物)。

微乳常作为给药系统研究,特别是在局部给药和透皮给药系统中^[17,18]。

3.2 乳化工艺制备微球颗粒

常用乳化蒸发法制备以聚合物为基质的微球载药颗粒,例如,疏水的载药 PLA 或 PLGA 可生物降解微球通过将含有药物和聚合物的二氯甲烷溶液分散在水相中形成乳剂而制备。载亲水药物的微球需要通过两步乳化法制备。用来稳定乳化相的表面活性剂会显著影响微球粒径、粒径分布、表面形态学、载药、药物释放和最终的多颗粒产品的生物学活性。

4. 气雾剂

表面活性剂在定量吸入剂(MDI)的溶液和混悬液处方中都有应用。制备吸入剂最常用的表面活性剂有 Span 85、油酸、浓度为 0.1%~2.0% 的卵磷脂(w/w)。这些都是不挥发的并在混合抛射剂中可溶的物质。在处方中的作用是润滑定量阀,在混悬剂处方中则是保持药物的分散性。

三种常用在氟氯烷烃(CFC)基 MDI 处方中的表面活性剂在 CFC 替代抛射剂(如氟氢烷烃 HFA 134a 和 HFA 227)中不溶。可能的替代处方包括使用添加剂如乙醇来帮助表面活性剂或新型表面活性剂的溶解。有几家公司研究了新材料,如含氟表面活性剂、聚氧乙烯和用表面活性剂包裹的药物^[19]。

在定量吸入混悬气雾剂中控制絮凝

控制絮凝在混悬剂系统的稳定中具有广泛的应用。目的是改变颗粒的表面电荷或凭借合适的稳定赋形剂通过空间位阻使颗粒分散。然而,这在非极性系统中如 CFC 抛射

剂中很难实现。Ranuzzi 等认为控制絮凝优化了 MDI 系统的稳定性^[20],但 Hickey 等反对这种说法^[21]。

5. 脂质体

脂质体是单层或多层磷脂囊泡,形状为不规则球形,由脂质层和水相区域交替组成。

脂质体作为给药系统有一定潜力。药物分子在脂质体内的分布由其理化组成和脂质的组成决定。水溶性药物分布在水相中,而油性药物填充在磷脂膜中。在由 Barenholz 等编写的《药剂剂型脂质体》(见 *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* 第一版第 9 卷)一文中详细介绍了脂质体在药剂中的应用^[22]。

半固体系统

表面活性剂是药物、化妆品和半固体食物处方中的主要成分,许多处方都是乳剂,有 o/w 型和 w/o 型。这都是由于表面活性剂具有增溶、稳定、润湿、去污和渗透增强的性质。

传统的油包水乳剂含有天然来源的表面活性剂如胆固醇、羊毛脂、羊毛醇、无水羊毛脂、脂肪酸二价皂盐、油酸钙或合成的具有低 HLB 值的试剂(具有高亲脂性),如 Span。这类产品的实例有英国药典的 Oily 乳膏,由 1:1 的羊毛醇和水的混合物组成。

水包油软膏,局部使用,通常含有混合乳化剂或表面活性剂,混合成分之一是有高 HLB 值的水溶性表面活性剂,通常是长链(如 C₁₄ 或 C₁₈ 链)脂肪醇或脂肪酸(如棕榈酸或硬脂酸)。水溶性表面活性剂可以是阴离子(如十二烷基硫酸钠)、阳离子(如溴化十六烷基三甲基铵)、非离子(如聚乙二醇和 Tween)。

使用这些混合表面活性剂不仅因为它们可以在液液界面形成复合凝固膜,增强乳剂的稳定性,还因为它们能使产品具有一定形状,可以形成半固体制剂而不是液体制剂。混合乳化剂形成贯穿乳剂连续相的黏弹性网络,从而控制软膏的黏度。网状结构是由于混合乳化剂和水相互作用,形成液晶相而产生的。

1. 泡沫剂

在气雾剂中利用乳化作用产生 o/w 型乳剂泡沫。液化抛射剂形成乳剂的分散相,而药物往往在连续水相中。从加压容器中释放后,抛射剂蒸发形成在水相中的气泡,从而产生泡沫。这种泡沫被称为“稳定泡沫”产品。另外,泡沫剂还能形成无水的稳定泡沫产品,这种情况下水被各种醇如聚乙二醇取代。当抛射剂在外相时,形成“快速破裂泡沫”。产品以泡沫形式释放出来再变成液体。

2. 透皮吸收的生物效应

表面活性剂传统上是局部给药载体的稳定剂和组成部分,从疏水的如油酸到亲水的如十二烷基硫酸钠,都作为

改善透皮吸收的渗透促进剂进行过研究。离子型表面活性剂被认为通过使脂质角质层紊乱或使角蛋白变性而促进吸收。Walters 综述了渗透促进剂和表面活性剂在透皮治疗系统中的应用^[23]。

固体剂型

表面活性剂广泛用于增加药物的溶出速率。这可以归结为润湿作用、增加表面积、增加溶解度、增加扩散系数或这几种机制协同作用的结果。因此表面活性剂用在胶囊和片剂的处方中改善润湿，降低药物颗粒的凝聚，以增加颗粒溶出的有效表面积。

这种润湿效果在低于 CMC 时有效。表面活性剂对固体药物溶出的影响是复杂的。除了增加有效表面积，浓度高于 CMC 的表面活性剂还能增强药物的溶解度，因此提高了有效浓度梯度。然而，由于药物溶解在胶束中，其有效扩散速率也降低了。有人建立了表面活性剂浓度对药物溶出影响的定量模型^[24]。对于那些表面溶蚀控制的固体溶出，表面活性剂可以进一步影响溶出过程。关于这一点，表面活性剂增加胆固醇溶出速率的影响已有广泛研究^[25]。

1. 硬胶囊剂和片剂

1.1 润湿剂

表面活性剂在胶囊剂^[26]和片剂中可作为润湿剂使用以辅助溶解。

1.2 润滑剂、抗黏剂和助流剂

片剂润滑剂的主要作用是降低压片和出片时片剂和模具体界面上的摩擦力。润滑剂也有抗吸附作用（即阻止黏冲和黏模圈）和助流作用（即改善颗粒或粉末的流动性），在硬胶囊壳的加工过程中也十分有用。

片剂生产中常用硬脂酸镁做润滑剂，这是界面润滑的例子，即分子的极性部分黏附在模圈壁的金属表面上。硬脂酸镁吸附在粉末或颗粒表面也可以阻止饲料凝聚并能助流。

助流剂可分为水溶性和水不溶性两种。后者比水溶性助流剂更有效，可以在低浓度下使用^[27]。常用的水不溶性助流剂有硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸钠和硬脂酸。水溶性助流剂有十二烷基硫酸钠和十二烷基硫酸镁。

十二烷基硫酸钠用于硬胶囊壳的生产，在制备过程中添加在明胶溶液中。预先润滑的不锈钢模具蘸入明胶溶液中，加入的十二烷基硫酸钠能降低表面张力，使模具杆头更均一地润湿^[28]。

2. 固体分散体系

疏水药物的生物利用度可通过增大药物的溶解度得到改善。这可以通过将药物在合适的亲水性聚合物介质（如 PEG 和 PVP）中形成固体分散体实现。药物通过以下方法

分散在介质中：从适当的含有药物和载体介质的溶液中共沉淀，与介质形成熔融化物或者通过相转变的方法。通过使用相对高浓度的介质和快速沉淀过程，药物可形成无定形或以分子形式分散在载体中形成高能相。大量研究者将表面活性剂作为载体材料以达到增强溶解度的效果。采用的表面活性剂有聚氧乙烯硬脂酸、Renex650、泊洛沙姆 188、Texafor AIP 去氧胆酸、Tween 和 Span。表面活性剂也可添加到传统的药物-聚合物固体分散体中进一步改善药物的释放性质。Sjokvist 等发现在 3%~10% 灰黄霉素-PEG 分散物中加入 1%~2% 的十二烷基硫酸钠可以消除痕量结晶药物，其中灰黄霉素以固体溶液存在。其他报道的含有三种化合物的固体分散体有 Tween 20-灰黄霉素-PEG 和 Tween 20-奥索地平-PEG^[30]。然而含有表面活性剂的体系稳定性存在问题，放置 12 个月后，溶出速率降低^[31]。

3. 骨架系统

药物从不崩解惰性基质如聚乙烯类疏水基质中的释放，可以通过溶出介质中表面活性剂的存在加以改善。药物释放是基质孔径分布和释放介质渗透压（由表面张力和接触角决定）共同作用的结果。加入琥珀酸二辛酯钠将接触角降低到 90° 以下，极大增加了药物释放，增加聚山梨酯浓度到 0.001%~0.1% 也有相同效果^[32]。表面活性剂也应用在骨架型给药体系中以利于溶出介质的渗透，从而增加药物释放的程度和速度。

4. 栓剂

许多非离子表面活性剂材料用作栓剂的基质。许多这些基质都是水分散性的，可以用水溶性或油性配方中。常用的表面活性剂有聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯（Tween）、聚氧乙烯硬脂酸酯和山梨醇脂肪酸酯（Span）。这些表面活性剂可以单一使用，也可以混合使用，或者其他栓剂基材混合以产生熔程宽和均匀的材料。

表面活性物质广泛与其他栓剂基质联合使用。这些组分的加入可以改善栓剂的润湿性和水溶性。此外，乳化的表面活性剂可以使不溶性物质在脂质基质中混悬^[33]。

在栓剂中加入表面活性剂可以增加栓剂的肠吸收，这是因为形成混合胶束的影响。有研究表明胶束的形成，有利于混合胶束中的脂质嵌入生物膜。这种脂质然后又增强了膜对难吸收药物的渗透性和流动性。还有研究表明结肠、直肠黏膜比小肠内的肠黏膜对混合胶束的作用更灵敏。

5. 表面活性剂对胃肠道药物吸收的影响

在口服给药剂型中的表面活性剂可以降低胃排空速率，增加处方黏度以延缓药物在吸收点的移动。这对聚氧乙烯衍生物尤为明显。生理表面活性剂——胆汁盐，可影响胃排空速率。胃中的胆汁盐也可以影响胃黏膜内的离子运动，从而增加氢离子和氯离子从腔内排出。

表面活性剂也可以通过影响生物膜的渗透性而影响药物吸收速率。表面活性剂分子和膜蛋白的竞争性结合对多



Y
 例药物吸收都有部分促进作用。或者,这种增强作用是由于膜蛋白因为一种或多种渗透性组分的结合而发生异构重排产生的。

Nakanishi^[34]等研究了一系列表面活性剂对磺胺脒肠吸收的影响,结果发现吸收增强了。这是由于直肠膜的组织学发生了改变,从而使渗透性增强。他们还发现脱氧胆酸钠和十二烷基硫酸钠这类表面活性剂和螯合剂如 EDTA 合用可以增加大分子如菊糖、胰岛素和白蛋白的肠吸收。

表面活性剂的膜作用可以解释为表面活性剂与膜的结合、因脂蛋白、蛋白和混合胶束增溶而造成的膜破裂、蛋白与蛋白的相互作用以及表面活性剂对膜组分的选择性增溶作用。表面活性剂的结构决定了特定表面活性剂影响药物吸收的范围和程度。研究表明 $C_{12} \sim C_{16}$ 碳氢链,聚乙烯链的长度为 10~20 个重复单元之间,分子面积在 $1.0 \sim 1.6 \text{ nm}^2$ 的分子对药物吸收的影响最大^[4]。当药物水溶性低时,这些影响因素以及药物溶解度的增加就可以提高吸收速率^[35,36]。

高浓度表面活性剂显示出一定毒性,通常会破坏生物膜。高浓度离子和非离子表面活性剂都会使覆盖上皮组织的黏膜层破裂,这是表面活性剂对膜本身的影响造成的膜代谢破坏,尤其是膜和酶系统共同作用时表现更明显。Weiner 和 Bernstein 综述了表面活性剂和药物处方其他组分共存时的副作用^[37]。

表面活性剂的直接作用

1. 去污剂

去污剂用来去除固体表面的污渍,这一过程涉及表面活性剂分子的很多特定作用。去污剂应该有良好的润湿性以确保和固体表面良好接触。还必须能将污渍移至溶液中。这是因为它降低了污物-液体和液-固间的界面张力,所以降低了污物和固体间的吸附功,使污物易于分开。一旦污物被分开,表面活性剂就吸附在污物颗粒表面阻止其再次结合到固体表面,使其被洗脱。如果颗粒是油性的,就会被表面活性剂乳化或增溶。

2. 抗菌剂

阳离子表面活性剂通常具有抗菌活性,尤其是四价化合物。四价的表面活性剂的作用机制是破坏细胞膜,使蛋白变性和酶抑制。相对低浓度的四价化合物可以溶解细胞,使细胞内容物渗漏到周围介质中。四价铵和某些磷表面活性剂用做皮肤病商品中的局部杀菌剂、外科手术中的擦手剂、皮肤伤口的冲洗剂。最常用的四价杀菌剂是氯化十六烷基吡啶,苯扎氯铵,苄索氯铵,溴化十六烷基三甲基铵^[38]。其他含有一种以上四价化合物(或阳离子基团)的表面活性剂是抗菌活性最强的化合物。这类化合物有乙氧克菌定、葡萄糖酸洗必泰,用做喉部锭剂和口腔洗液。虽然阴离子表面活性剂抗菌活性较弱,但是也可以引起细胞

破裂。一系列阴离子表面活性剂,尤其是十二烷基硫酸钠及其类似物在口腔洗剂中有广泛应用^[38]。

3. 呼吸窘迫综合征(RDS)

1959 年,发现表面活性剂不足是引起婴儿呼吸窘迫综合征的主要致病因素^[39]。肺表面活性剂是磷脂、中性脂质和特定蛋白的复杂混合物,这种混合物在肺部的气-液界面间铺展成单分子层,降低呼气末相的表面张力从而阻止肺泡塌陷。如果内源性表面活性剂不足,吸气压和呼吸功就会增加,以使在每次呼吸中扩大肺泡使气体交换足够。随着婴儿逐渐疲惫,就会出现渐进的呼吸窘迫。

卵磷脂是最主要的内源性表面活性剂,含有 60% 总磷脂成分,二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)是降低表面张力的主要磷脂。

表面活性剂替代疗法可以使用天然的或人工合成的表面活性剂。天然表面活性剂来源于牛或猪等动物的肺以及人的羊水。合成的表面活性剂由 DPPC 和铺展剂如不饱和磷脂酰甘油、四丁酚酞或十六醇组成^[40]。

天然来源的表面活性剂

在天然来源的表面活性剂中,胆酸盐和磷脂特别重要。

1. 磷脂

磷脂广泛发现于生物膜中,可用做静脉注射脂肪乳的乳化剂,也是脂质体的主要组成部分。阐明控制药物在磷脂分散物中增溶的因素为体内脂质系统相互作用的生理学作用提供一些可以借鉴的线索^[4]。上章和在脂质体一章的参考文献[22]中已经对磷脂进行过讨论。

2. 胆酸盐

胆酸盐是有环戊烯非核的 $C_{22} \sim C_{28}$ 羧酸,含有 3~9 个碳原子支链。它们形成结构上和传统球形胶束不同的胶束,具有两亲性碳氢链。胆酸盐的疏水特性是由于其一个表面具有甾核,导致分子间结合受限引起。有人曾提出一级胶束和二级胶束的概念,前者是由 2~4 个分子构成,后者是由一级胶束聚集形成。CMC 不明显,高度依赖于特定胆酸盐的结构,特别是羟基的数量和方向。

在评价胆酸盐对难溶性药物生物利用度的影响方面做了很多研究。例如,胆酸盐可以增强磺胺脒和尿抑胃素的吸收。胆酸盐也可以增加药物从肠腔向体循环的转运。这样的吸收需要抵抗药物通过水层和上皮膜的阻力。

胆酸盐能和类脂化合物如卵磷脂或脂肪酸形成混合胶束。这些混合胶束在结构上与简单胶束有很大的不同,通常对生物或合成的疏水分子有强增溶能力。例如,非极性的水不溶性分子 DDT 在胆酸盐胶束溶液中的溶解度可以通过加入长链不饱和脂肪酸而显著增强,这就是形成混合胶束的缘故。

3. 皂角苷

皂角苷是从某种可以使水溶液起泡的植物中发现的甙类成分。“皂角苷”这个词是从拉丁文“sapo”得来的，意思是肥皂。含有甙类的植物由于其去污特性在世界各地广泛使用了很长时间。例如，在欧洲，使用石碱草的根，在南美洲，使用皂树的树皮^[41]。

皂角苷的结构是甙体（通常是四环三萜或五环三萜）。三萜皂角苷在皂树树皮和甘草根中发现。英国药典规定的皂树皮是干燥的皂树属皂角树的皮，其他种类皂树作为乳化剂使用。甘草的根也含有三萜皂苷，在药房长期用于调味、润湿、温和化痰。

4. 免疫刺激复合物

免疫刺激复合物（ISCOMS）是由胆固醇、磷脂和 Quil A（从皂树中提取）组成，粒径在 40~100nm 间的稳定复合物。它们是亚单位疫苗抗体具有良好前景的载体。免疫刺激复合物被认为具有多胶束结构，通过疏水作用、静电排斥作用、空间因素和氢键作用成型稳定^[42]。通过接种以免疫刺激复合物为基质的疫苗可以获得保护作用，抵抗 Epstein-Barr 病毒和麻疹病毒的侵袭^[44]。

药物表面活性

许多药物分子表现出表面活性，即它们有在界面富集、降低表面张力和在溶液中形成聚集体的趋势。虽然大多数药物的疏水基团是芳香族的，它们仍表现出典型的表面活性剂（含有柔性疏水链）特性，因为这些芳香基团有高度柔性（参考文献 [4] 综述了具有表面活性剂特性的可以降低表面张力的药物）。

大多数药物在体内不能达到形成胶束的浓度。因此它们的表面活性而非自结合趋势具有更重要的生理学意义。表面活性剂药物易于和蛋白质以及其他大分子疏水键合，然后和其他两亲性物质如胆酸盐、磷脂和受体结合。和其他表面活性物质相比，表面活性药物可以直接和生物膜作用。Attwood 和 Florence^[4] 讨论了吩噻嗪表面活性对镇静和局麻的生理学影响。

参考文献

- Rupprecht, H.; Lee, G. Adsorption at Solid Surfaces. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 1st Ed.; Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1988; 1, 73-114.
- Myers, D. Surfaces and Interfaces: General Concepts. Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications; VCH Publishers Inc.; New York, 1991, 7-24.
- Rosen, M. J. Surfactants and Interfacial Phenomena; Wiley Interscience; New York, 1989.
- Attwood, D.; Florence, A. T. Surfactant Systems. Their Chemistry, Pharmacy and Biology; Chapman and Hall; London, New York, 1983.
- Lawrence, M. J. Surfactant Systems: Their Use in Drug Delivery. Chem. Soc. Rev. 1994, 23 (6), 417-424.
- Corrigan, O. I.; Healy, A. M. Surfactants in Pharmaceutical Products and Systems. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 1st Ed.; Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1996; 14, 295-331.
- Florence, A. T. Drug Solubilization in Surfactant Systems, Drugs and the Pharmaceutical Sciences. Techniques of Solubilization of Drugs; Yalkowsky, S., Swarbrick, J., Eds.; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1982; 12, 15-89.
- Ong, J. T. H.; Manoukian, E. Micellar Solubilization of Timobesone Acetate in Aqueous and Aqueous Propylene Glycol Solutions of Nonionic Surfactants. Pharm. Res. 1988, 5 (11), 704-708.
- Fahelelbom, K. M. S.; Timoney, R. F.; Corrigan, O. I. Micellar Solubilization of Clofazimine Analogs in Aqueous Solutions of Ionic and Nonionic Surfactants. Pharm. Res. 1993, 10 (4), 631-634.
- Riess, G.; Hurtrez, G.; Bahadur, P. Block Copolymers. Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 2nd Ed.; Mark, H. F., Bikales, N. M., Overberger, C. G., Menges, G., Eds.; Wiley-Interscience; New York, 1985; 2, 324-434.
- Kataoka, K.; Kwon, G. S.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y. Block-Copolymer Micelles as Vehicles for Drug Delivery. J. Control. Release 1993, 24 (1-3), 119-132.
- Yokoyama, M.; Miyauchi, M.; Yamada, N.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K.; Inoue, S. Polymer Micelles as Novel Drug Carrier—Adriamycin-Conjugated Poly (Ethylene Glycol) Poly (Aspartic Acid) Block Copolymer. J. Control. Release 1990, 11 (1-3), 269-278.
- Kwon, G. S.; Naito, M.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K. Physical Entrapment of Adriamycin in AB Block Copolymer Micelles. Pharm. Res. 1995, 12 (2), 192-195.
- Martin, A. N.; Bustamante, P. Physical Pharmacy; Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences, 4th Ed.; Lea and Febiger; Philadelphia, 1993, 386-388, 541-542.
- Carrigan, P. J.; Bates, T. R. Biopharmaceutics of Drugs Administered in Lipid-Containing Dosage Forms I: GI Absorption of Griseofulvin from an Oil-in-Water Emulsion in the Rat. J. Pharm. Sci. 1973, 62, 1476-1479.



16. Eccleston, G. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 1st Ed.; Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1992; 5, 137—188.
17. Osborne, D. W.; Ward, A. J. I.; O'Neill, K. J. Microemulsions as Topical Drug Delivery Vehicles I. Characterization of a Model System. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1988, 14 (9), 1203—1219.
18. Linn, E. E.; Pohland, R. C.; Byrd, T. K. Microemulsions for Intradermal Delivery of Cetyl Alcohol and Octyl Dimethyl PABA. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1990, 16 (6), 899—920.
19. Bowman, P. A.; Greenleaf, D. Non-CFC Metered Dose Inhalers; The Patent Landscape. *Int. J. Pharm.* 1999, 86 (1), 91—94.
20. Ranucci, J. A.; Dixit, S.; Bray, R., Jr.; Goldman, D. Application of Controlled Flocculation to Metered Dose Aerosols Suspensions. *Pharm. Res.* 1987, 4 (2 suppl.), S-25.
21. Hickey, A. J.; Dalby, R. N.; Byron, P. R. Effects of Surfactants on Aerosol Powders in Suspension, Implications for Airborne Particle Size. *Int. J. Pharm.* 1988, 42, 267—270.
22. Barenholz, Y.; Crommelin, D. J. A. Liposomes as Pharmaceutical Dosage Forms. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 1st Ed.; Swarbrick, J., Boylan, J. C. Eds.; Marcel Dekker, Inc. New York, 1994; 9, 1—39.
23. Walters, K. A. Penetration Enhancers and Their Use in Transdermal Therapeutic Systems. *Transdermal Drug Delivery; Drugs and the Pharmaceutical Sciences; Hadgraft, J., Guy, R. H., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1989; 35, 197—246.*
24. Higuchi, W. I. Diffusional Models Useful in Biopharmaceutics. *Drug Release Rate Processes. J. Pharm. Sci.* 1967, 56, 315—324.
25. Higuchi, W. I.; Su, C. C.; Park, J. Y.; Gulari, E. Mechanism of Cholesterol Gallstone Dissolution. Analysis of the Kinetics of Cholesterol Monohydrate Dissolution in Taurocholate/Lecithin Solutions by the Mazer, Benedek, and Carey Models. *J. Phys. Chem.* 1981, 85 (2), 127—129.
26. Newton, J. M.; Rowley, G.; Törnblom, J-F. V. Further Studies on the Effect of Additives on the Release of Drug from Hard Gelatin Capsules. *J. Pharm. Pharmac.* 1971, 23 (suppl.), 156S—160S.
27. Banker, G. S.; Peck, G. E.; Baley, G. Tablet Formulation and Design. *Pharmaceutical Dosage Forms; Tablets; Lieberman, H. A., Lachman, L., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1980; 1, 61—107.*
28. Jones, B. E. Gelatin Additives, Substitutes and Extenders. *Hard Capsules; Development and Technology; Ridgway, K., Ed.; The Pharmaceutical Press: London, 1987; 54.*
29. Sjöqvist, E.; Nyström, C.; Aldén, M. Physicochemical Aspects of Drug Release, 13. The Effect of Sodium Dodecyl-Sulfate Additions on the Structure and Dissolution of a Drug in Solid Dispersions. *Int. J. Pharm.* 1991, 69 (1), 53—62.
30. Veiga, M. D.; Escobar, C.; Bernad, M. J. Dissolution Behavior of Drugs from Binary and Ternary Systems. *Int. J. Pharm.* 1993, 93 (1—3), 215—220.
31. Sjöqvist-Saers, E.; Nyström, C.; Aldén, M. Physicochemical Aspects of Drug Release, 16. The Effect of Storage on Drug Dissolution from Solid Dispersions and the Influence of Cooling Rate and Incorporation of Surfactant. *Int. J. Pharm.* 1993, 90 (2), 105—118.
32. Singh, P.; Desai, S. J.; Simonelli, A. P.; Higuchi, W. I. Role of Wetting on the Rate of Drug Release from Inert Matrices. *J. Pharm. Sci.* 1968, 57 (2), 217—226.
33. Cohen, L. J.; Lieberman, H. A. *Suppositories. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, 3rd Ed.; Lachman, L., Lieberman, H. A., Kanig, J. L., Eds.; Lea & Febiger; Philadelphia, 1986; 564—588.
34. Nakanishi, K.; Masada, M.; Nadai, T. Effect of Pharmaceutical Adjuvants on the Rectal Permeability to Drugs. IV. Effect of Pharmaceutical Adjuvants on the Rectal Permeability to Macromolecular Compounds in the Rat. *Chem. Pharm. Bull.* 1984, 32, 1628—1632.
35. O'Reilly, J. R.; Corrigan, O. I.; O'Driscoll, C. M. The Effect of Simple Micellar Systems on the Solubility and Intestinal-Absorption of Clofazimine (B663) in the Anesthetized Rat. *Int. J. Pharm.* 1994, 105 (2), 137—146.
36. O'Reilly, J. R.; Corrigan, O. I.; O'Driscoll, C. M. The Effect of Mixed Micellar Systems, Bile-Salt Fatty-Acids, on the Solubility and Intestinal-Absorption of Clofazimine (B663) in the Anesthetized Rat. *Int. J. Pharm.* 1994, 109 (2), 147—154.
37. Weiner, M.; Bernstein, I. L. *Adverse Reactions to Drug Formulation Agents; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1989.*
38. Rieger, M. M. *Surfactants. Pharmaceutical Dosage Forms; Disperse Systems*, 2nd Ed.; Lieberman, H. A., Rieger, M. M., Banker, G. S., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1996; 1, 211—286.
39. Avery, M. E.; Mead, J. Surface Properties in Relation to Atelectasis and Hyaline Membrane Disease. *Am. J. Dis. Child.* 1959, 97, 517—526.
40. Fujiwara, T.; Maeta, H.; Chida, S.; Morita, T.;

- Watabe, Y.; Abe, T. Artificial Surfactant Therapy in Hyaline-Membrane Disease. *Lancet* 1980, 1, 55—59.
41. Evans, W. C. Saponins, Cardioactive Drugs and Other Steroids. Trease and Evans' Pharmacognosy, 14th Ed.; WB Saunders Company Ltd.: London, 1996; 293—309.
42. Kersten, G. F. A. Aspects of Iscoms. Structural, Pharmaceutical and Adjuvant Properties; Ph.D. Thesis, University of Utrecht, 1990; 93—104.
43. Morgan, A. J.; Finerty, S.; Lövgren, K.; Scullion, F. T.; Morein, B. Prevention of Epstein-Barr (EB) Virus-Induced Lymphoma in Cottontop Tamarins by Vaccination with the EB Virus Envelope Glycoprotein GP 340 Incorporated into Immune-Stimulating Complexes. *J. Gen. Virol.* 1988, 69, 2093—2096.
44. de Vries, P.; van Binnendijk, R.; van der Marel, P.; van Wezel, A. L.; Voorma, H. O.; Sundquist, B.; UytdeHaag, F. G. C. M.; Osterhaus, A. D. M. E. Measles Virus Fusion Protein Presented in an Immune-Stimulating Complex (iscom) Induces Haemolysis-Inhibiting and Fusion-Inhibiting Antibodies, Virus Specific T Cells and Protection in Mice. *J. Gen. Virol.* 1988, 69, 549—559.

(刘小叶 译)



药品临床试验管理规范(GCP)概述

Richard A. Guarino

Oxford Pharmaceutical Resources, Inc., Totowa, New Jersey, U. S. A.

引言

联邦管理法规 (CFR) 中部分章节 (CFR21 条 312 款)^[1] 药品临床试验管理规范 (Good Clinical Practice, GCP) 详细描述了在新药的研发过程中, 临床研究者、药物申请人和临床研究监察者各自的责任。这些责任, 以及每个参与者的道德和参加临床研究人员对受试者的伦理责任, 构成了 GCP 的核心。正如表单 1572^[2] 中所列, 长期以来 GCP 是针对研究者的规范, 但是在 1977 年和 1978 年, 第一次提议规范也适用于药物申请人、临床研究者和临床研究监察者, 并且第一次实施。10 年后的 1987 年, GCP 作为 CFR 的正式法规发布。今天, 药物申请人、临床研究者和临床研究监督者都需要依法遵守这些 GCP。

为了开展满足 FDA 要求的临床研究以获得新药的批准, 正确理解 GCP 的规则及其对药物、设备和生物制品的临床研发过程的影响是非常重要的。

1987 年, 对于研究中新药 (investigational new drug, IND), 新版 CFR 的规章 (比旧版表述得更加清晰) 详细表述了临床试验过程中参与者的责任, 不仅研究者在评估新药、设备和生物制品对受试者的有效性和安全性中负有主要责任, 临床研究者和临床研究监察者也对受试者的安全和权益负有同等责任。GCP 规范下的主要参与者如下, 这些名词在整篇文章中会被引述。

研究者: 研究者是从事临床研究的个体 (例如, 药物是根据其指导服用或调剂给患者)。如果临床研究机构中有多个研究者, 则有一人被指定为主要研究者 (PI), 其在研究团队中是负主要责任的领导者。次级研究者是主要研究者确认的团队中其他研究者。这些人通常是注册医师或者在注册医师指导下工作的人^[3]。

申请人/研究者: 申请人/研究者是既启动研究又从事研究的个体 (例如, 药物是根据其直接的指导服用或调剂)。这类个体通常指在新药研究者领导下从事临床研究的医师^[4]。

申请人: 申请人指发起并对临床研究负责的个体或者组织, 可能是个人、制药企业、政府机构、科研机构或者私有的及其他组织^[5]。

监察者: 监察者是由申请人指定的, 经过培训有资格支持和监督研究过程的人员^[6]。

研究者的责任

在 CFR21 条 312.53 款^[7] 中, 规则列举了 FDA1572 提

供的描述性信息, 即研究者的声明, 还包括对临床研究者的选择要求。以前, 要进行 I 期和 II 期临床研究, 研究者必须完成一份 FDA1572 研究声明表; 要进行 III 期和 IV 期临床研究, 研究者必须完成一份 FDA1573 研究声明表。根据临床研究新药重新修订的规章, FDA1573 不再用于临床研究。目前, 从 I 期到 IV 期临床研究均只需完成 FDA1572 即可。该文件规定了研究者在研究中的责任, 除了 FDA 1572 上一些基本内容, 增添的新内容项目包括: 临床实验室名称和地址, 机构检查委员会 (IRB) 地址^[8], 该委员会负责对协议、患者同意书和研究者的检查和批准, 还规定申请人必须选择合格的研究者, 这些研究者依靠经验和培训有能力从事研究。“经验和训练”, FDA 意思指对某种疾病开展新药研究的临床研究者应该在这一领域有足够的经验, 能够正确观察新药治疗的疾病体征、症状和疾病进程。例如, 如果新药针对产科/妇科, 那么儿科医师不能作为专家评价这个药, 同样心血管医师不能作为专家评价胃肠道用药。

研究者指已经在表单上签名和完成了 FDA1572 表单或者在表单上列出的合作者和次级研究者, 在学历和经验方面他们应该有资格参与临床研究。

在 FDA1572 表单背面的“Fine Print”一项中规定了研究者必须向申请人保证研究是根据合适的研究计划 (例如实验设计) 进行的^[9], 按照 GCP 要求观察。研究计划中包含有研究者必须获得在他们的司法管辖区内有参加临床研究的患者或者受试者签名的知情同意书^[10]。FDA1572 表单还规定研究者需要提交具有处理不良反应情况的经验证明, 并保证阅读并理解了研究者手册。此外, 在研究者的领导下, 参与研究监督的研究者要意识到自己的责任。一旦研究者签订了 FDA1572 表单, 他更要保证按照要求向权威机构 IRB 提交研究材料、协议和其他相关资料以供审查, 除此之外还要提供详细的个人简历, 保证遵守研究协议中的研究计划。

总之, 临床试验中研究者的首要责任是, 对所有受试者和患者要有伦理和道德。研究者必须为每位受试者提供安全措施, 以保证在新药试验中患者受到保护, 避免可能发生的危害。在规定了研究者责任, 研究者签订了 FDA1572 表单后, 应该询问申请人任何必要的附加信息, 对程序的任何疑问应该提出。研究者具有以下责任: ①保证研究是根据一份签署的研究声明、研究计划和可适用的规章开展的; ②对未批准的药的临床研究中, 保护受试者的权利与安全, 研究者必须保证在研究过程中对受试药品完全可控并负责。研究者必须获得即将给药的受试者知情同意书, 并且只能在研究者的监督下服用受试药品, 或者



在对研究者负责的次级研究者监督下服用受试药品。研究者不得给未参加临床研究的任何人员服用受试药品。

研究者被要求保留试验用药品的配置记录,包括日期、总量和受试者的用量^[11]。如果试验结束、中断或完成,研究者应该说明并将剩余的药品归还给申请人,否则提供处理剩余药物的书面报告。研究者还应保留记录受试者所有观察和其他相关资料的病历(通常以完整的病历报告和用药记录完成)。

在新药被批准用于临床试验的适应证后两年内,研究者应保留所有参与试验的受试者的记录。如果药物的申请没有被批准,那么在研究中断或者试验新药被停止,FDA已经通知申请者申请的状态后,研究者也应保留相应的试验记录两年^[12]。

研究者应将所有的试验报告交给药物申请人,申请人有权利收集和评价结果。申请人也应在临床研究过程中呈递年度报告给FDA。

研究者应及时向申请人汇报确认可能由药物引起的任何不良反应,如果不良反应比较严重^[13],研究者更应马上汇报(见不良反应汇报章节)。

试验结束之后,研究者应迅速向申请人提供完整的报告。

其他研究者的责任

研究者必须保证IRB遵守CRF中的规则,IRB要对最初和中间过程的检查负责,认可计划的临床研究。研究者也必须保证向IRB及时汇报试验过程中的变故以及所有未预料的问题,包括对受试者的不良反应和其他问题。另外,没有IRB的批准,研究者不能对协议中的试验做任何修改,除非有必要去除对受试者的明显的危险。

在适当的时候,研究者将回答来自政府相关部门或者FDA官员的提问,允许他们拷贝、查证研究者做的任何记录和报告。研究者不需要泄漏受试者的姓名,除非个别受试者的记录需要更详细的研究或者有理由认为记录不能代表真实的情况或者不能代表实际的试验结果。

申请人的责任

申请人的基本责任在CFR21条312.50款^[14]中有详细规定,就是保证遵照FDA的规定进行临床研究。申请人有权选定合格的研究者,遵照公开发行的规章提供给他们相应的试验信息。通常申请人要为可能的研究者提供一本研究手册和临床研究协议。研究者手册^[15]包括非临床的研究和报告,以及以前人体的药效和安全的研究报告,这些报告能够反映受试药物成分的患者早期用药经历。

出于申请者的基本利益,申请人可以选择将部分或全部临床研究的责任委托给合同研究组织(CRO)^[16]。在过去十几年中,CRO在新药开发中扮演着重要角色。然而,与申请人签约的CRO必须服从同样的GCP规章,就像本

章所描述的。在现在的CFR21条312.52款^[17]中明确规定,委托研究不管是全部还是部分必须经过双方同意,并以书面形式实施。FDA规定任何没有以书面形式由申请者描述的委托都被认为无效,申请者对这些未经书面形式明确的责任负责。FDA进一步规定,CRO(一旦与申请人签署委托协议)必须服从所有条例。如果在履行合同的过程中,CRO没有符合FDA规则的要求,CRO与申请人一样受到规则的同样处罚。作为这种规定的结果,一旦两者法律委托研究形成,对于CRO来说,可能要维护申请者的利益。尽管CRO必须承担签署的责任,但是在CRO的监察下保证数据的质量和完整性仍然是申请者的责任。在这种情况下,尽管临床研究委托给CRO,申请者将扮演质量检查员的角色^[18]。总之,以下几点必须强调:任何委托研究必须以书面形式表达;如果不是所有责任委托,由CRO承担的责任必须在书面文件中表明清楚;文件中没有涉及的委托责任将被认为没有被委托。规章中也指明申请人对药品的存货及控制负责。只有参加临床试验的研究者可以接受和有权利使用试验的药物和材料。

申请人和监察员的责任

申请人的一个重要责任是在规则(CFR21条312.56款)^[19]指导下监督临床研究的进度。监察员的责任是在申请者的赞助下保证在临床试验过程中对研究者出现的不足得以纠正,保证研究者履行研究计划。被任命的临床研究监察员有权力保证研究者服从签署的FDA1572表单的规定以及试验计划和协议得到执行。如果在此过程中,研究者不纠正其错误,在研究过程中无改进,监察者将确保其服从或者停止对研究者提供药物,剥夺研究者的试验研究权利。另外,监察者在监察过程中需要评估试验过程中的安全性和有效性等问题,同时申请者应该向FDA汇报有关药物安全的报告,因为这是FDA规则312.32款^[20]中对他们的要求。

当临床研究监察者向申请人汇报不良反应时,申请人有责任决定该不良反应是否对受试者构成不明原因或明显的危险^[21]。同时,申请人必须决定试验是否中止。更重要的是,在任何时候,申请人都有责任向FDA、IRB和所有参与临床研究和处方研究用药的研究者汇报不良反应的情况。随后,申请人需要向FDA提供关于申请者采取的行动和决定是否中止研究的完整报告。如果在不良反应严重性的基础上决定中断试验,试验研究将在决定下达的7天内停止。

正确理解监察者的责任是非常重要的,包括确保所有记录和数据真实合理地反映研究者所收集的数据,应与参与研究的研究者的医学和医院记录一致。详细的审核和文件确保申请人的利益,监察员监督研究者收集的临床资料,GCP能够被执行^[22]。许多监察员会误认为他们的任务只是保证资料正确的录入。事实上,在监察者的义务中有一点是非常重要的,关注任何预示有对受试者的安全的不良反

Y

应或者实验研究数据的偏差。这一点在多临床中心研究中是确实存在的,在多中心研究中,许多中心按照同样的方案研究,许多监察员审核资料。如果不正常的反应或者试验研究的偏差以一个又一个中心记录,监察者应该比较观察结果,评价这些偏差累积的百分比,同时,当对所有中心的数据计算后,一些偶尔发生的小的偏差能够证明是显著的偏差。如果监察者足够机敏,他们能够防止伤害受试者不良反应事件的重复发生。

监察者的另一个责任是确保记录准确,包括药物的接受、运输和处理。这些记录包括药物交付的研究者的姓名、日期、数量、每批药物的批号等。监察者/申请人应该确保在试验中断或结束时每个研究者归还所有未使用的药品辅料。申请人可以制定一个处理未使用物品的方案,确保不对他人产生危害。虽然这些责任都应当由申请人承担,但同时也是对监察者的一种潜在职责。

同样,在试验研究阶段,研究者也有责任保留与申请者同样的记录^[23]。他们被要求保留足够的药品处置记录,包括日期、数量和受试者的使用量。若临床试验中止、中断或完成,研究者应将所有未使用药品返还给申请人或者另外向申请人提交一份如何处置剩余药品的文件(推荐研究者返还未使用药品)。研究者被要求记录并保存每一个受试者的详细病例报告(设计成记录所有观察者和与研究者的相关资料)。监察者应确保所有以前操作过程及时记录和汇报。

研究者经常忽略的一个职责是向申请人提交阶段性汇报。研究者应该向申请者提供进展报告,包括进行中的试验最新资料。有关临床研究进展的年度报告应由申请人向FDA提供,该报告的内容以研究者的进度报告为基础^[24]。安全性报告属于另一类问题。研究者应迅速向申请人汇报任何有理由确定或者可能确定的由药物引起的不良反应。严重不良反应(如危害患者安全的严重不良反应)及时向申请人汇报^[25]。最后,当研究者完成或结束研究,应向申请人提供最终报告。这份报告应在完成试验后迅速提交给申请者,该报告应总结研究的最终结果和临床研究期间药物的不良反应事件。监察者应负责督促研究者呈递以上所有的完整报告内容。如果研究者的职责已经履行完毕,应由监察者完成后续工作。通常是由临床监察者向研究者提供临床总结报告。

研究者、申请人和监察者的任何疏漏都要负法律责任。CFR312.58款^[26]规定,应FDA官员或雇员的要求,FDA有权检查申请人的记录或报告。这些检查通常在合理的时间进行,允许FDA官员复印和验证任何与临床研究和受试药物IND相关的记录。FDA规定申请人必须以书面形式向FDA提交试验记录、报告或其复印本。研究者不需向FDA官员透露受试者姓名,除非需要详细查看该受试者的病例记录。

GCP 违约行为

如果研究者屡次或故意违反GCP的规定,或向申请人

提供的报告中包含虚假信息,后果是什么呢^[27]?首先,药品评价和研究中心(CDER)或生物制品评价和研究中心(CBER)将以事件的书面形式通知研究者,并给研究者以书面或者在研究者的选择下以非正式讨论会的形式解释该事件。如果研究者给出的解释不能使CDER或CBER认可,研究者还有机会参加正式听证会。听证会将讨论该研究者是否还有资格接收试验用新药。综合评价所有信息后,包括研究者提供的解释理由,FDA委员将判断研究者是否是故意屡次违反GCP规定或故意屡次向申请人汇报错误信息。然后FDA委员将通知研究者和申请人,说明该研究者不能继续接收临床试验药品。没有合理的理由,FDA委员和委员会无权中止临床试验。申请人可停止向违反临床研究方案的研究者提供临床试验药品。如果申请人的这种行为有事实根据,研究者将接受进一步调查,调查包括每一个试验药、每一个批准的申请,连同研究者的资料报告提交给FDA。因此,该研究者开展的任何临床试验都要审查决定其是否提供虚假的资料,采用同样研究方案的其他临床试验将被暂停。相反,在由研究者去除虚假数据后,FDA官员应决定其余数据能否证明其他临床研究中心的数据是否合理。但如果该试验对公众健康产生极大危害,FDA官员应立即中止IND临床试验,并通知申请人,申请人有权在FDA决定是否恢复IND临床试验之前参与行政听证会。如果FDA官员认为研究者提供的数据不可靠并且数据不能证明是合理的,FDA官员可依据《联邦食品、药品与化妆品法案》(FD&C)撤销该药品的临床研究批准。因此,已经被认为不能胜任临床研究的研究者将被列入黑名单,不得参与任何临床试验研究。当FDA官员认为该研究者能够依照GCP规定进行临床试验时,可以恢复其参与临床研究的资格。

总之,研究者在承担责任参与IND临床试验前,签署FDA1572表时必须明白自己所承担的法律职责。研究者必须遵守临床研究方案和相关法律、法规以及GCP指南。研究者必须意识到如果不遵守联邦法律并且影响其声誉,最终将丧失参与临床试验的资格。研究者应明白,准确收集临床研究数据是法律强制义务。试验的设计方案必须能够在保障受试者安全的前提下评价药品的疗效。

CFR21条312.58款也规定申请人与监察者都必须遵守GCP。FDA调查员允许检查申请人提交的文件,介入临床监察者的工作,保证GCP要求实施。研究者必须仔细审查病例报告表与临床结果。一旦FDA调查员发现申请人、研究者与CRO(如它的文件)的三份数据存在差异,三方均负有法律责任,IND临床试验将被中止直至问题被解决。

研究者、申请人和监察者的责任必须依据GCP规定履行。在保证参与临床研究的每个研究者履行其合法责任时,申请者和监察者充当一致与持续的管理角色是至关重要的。任何成功的临床试验都依赖于合作、理解以及三方的默契沟通。明确了各自责任,并且有了有组织的临床研究计划,临床试验结果才会为新药申请提供有效的数据保证。

参考文献

1. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 312, (annually).
2. Guarino, R. A. The Investigational New Drug Application and the Investigator's Brochure. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 74—75.
3. Guarino, R. A. Obligations of the Investigator, Sponsor, and Monitor. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 326.
4. Guarino, R. A. The Investigational New Drug Application and the Investigator's Brochure. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 56.
5. Guarino, R. A. Obligations of the Investigator, Sponsor, and Monitor. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 329.
6. Guarino, R. A. Obligations of the Investigator, Sponsor, and Monitor. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 330.
7. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 312.53, (annually) .
8. Guarino, R. A. Institutional Review Board/Independent Ethics Committee and Informed Consent. Protecting Subjects Throughout the Clinical Research Process. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 271.
9. Guarino, R. A. Clinical Research Protocols. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 219.
10. Guarino, R. A. Institutional Review Board/Independent Ethics Committee and Informed Consent; Protecting Subjects Throughout the Clinical Research Process. New Drug Approval Process, 3rd Ed. Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 278.
11. Guarino, R. A. Obligations of the Investigator, Sponsor, and Monitor. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 328.
12. Guarino, R. A. Obligations of the Investigator, Sponsor, and Monitor. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 328.
13. Guarino, R. A. Adverse Reactions and Interactions of Drugs. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 247.
14. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 312.50, (annually) .
15. Guarino, R. A. The Investigational New Drug Application and the Investigator's Brochure. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 86.
16. Guarino, R. A. Working with a CRO. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 439.
17. Code of Federal Regulations Title 21, Part 312.52, (annually) .
18. Guarino, R. A. Quality Assurance. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 349.
19. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 312.56, (annually).
20. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 312.32, (annually).
21. Guarino, R. A. Adverse Reactions and Interactions of Drugs. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 262—263.
22. Guarino, R. A. Obligations of the Investigator, Sponsor, and Monitor. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 330—334.
23. Guarino, R. A. Obligations of the Investigator, Sponsor, and Monitor. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 331.
24. Guarino, R. A. Obligations of the Investigator, Sponsor, and Monitor. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 332.
25. Guarino, R. A. Adverse Reactions and Interactions of Drugs. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 260.
26. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 312.58, (annually) .
27. Guarino, R. A. Obligations of the Investigator, Sponsor, and Monitor. New Drug Approval Process, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000; 100, 332—333.
28. Guarino, R. A. Clinical Research: The Obligations of the Investigator, Sponsor, and Monitor. Drug Info. J. 1978, 12 (3), 157.
29. Guarino, R. A.; Cox, B. S. Practice and Application of Good Clinical Practices; Cooperation with St. John's University; New York, Oct 1982; The American Federation for Clinical Research Eastern Section.
30. Guarino, R. A. Practice and Application of Good Clinical Practices. Concepts and Strategies in New Drug Development; Clinical Pharmacology and Therapeutic Series Praeger Publishers; New York, 1983; 4.
31. Guarino, R. A. Role of the MD in Protocol Design; Applied Clinical Trials Conference and Exhibition; Reston, VA, 1993.



Y

32. Guarino, R. A. Clinical Study Conduct/Procedures; Drug Information Association Meeting; Chicago, IL, July 1993.
33. Stuart, J. P. Clinical Trials. A Practical Approach; John Wiley & Sons; New York, 1983.
34. MacKintosh, D. R.; Zepp, V. J. GCP Responsibilities of Principal Investigators; Beyond the 1572. Appl. Clin. Trials Nov. 1996, 32—40.
35. MacKintosh, D. R.; Zepp, V. J. Source Documentation; A Key to GCP Compliance in Clinical Trials. Appl. Clin. Trials Mar. 1996, 42—46.
36. Souza, K.; Small, R. D. The use of Total Quality Management Principles in Placing and Monitoring Clinical Trials. Drug Info. J. 1995, 29 , 695—703.

(黄 卓 陈 阳 译)

药品生产质量管理规范(GMP)概述

Ira R. Berry

Duramed Pharmaceuticals, Inc., Somerset, New Jersey, U. S. A.

引言

自 1962 年 Kefauver-Harris 药品修正案^[1,2]通过并首次公布以来, FDA 发布的成品药的现行优良制造规范 (current Good Manufacturing Practice, cGMP) 已是一个热点话题。优良制造规范 (Good Manufacturing Practice, GMP) 旨在为医药行业建立最低限度的生产和控制规范, 它所关注的是需要什么去做而不是应该怎么做。不符合在美国联邦法典 CFR21 条 210 和 211 款中要求的优良制造规范^[3], 构成药物掺假进入州际商务的, 会受行政起诉。这些要求适用于人用和兽用药品, 在 210 部分的法规是介绍性的, 在 211 部分中包括了更多详细的法规, 这将在本章中进行讨论。

20 世纪 70 年代后期, FDA 组织了一个特别工作组来研究 GMP, 修改后的 GMP 于 1978 年 9 月颁布, 并于 1979 年 3 月成为正式的法规, 同时 FDA 也考虑针对小容量的注射用药、医用气体和麻醉药品建立更专门的 GMP 规范以补充现有的法规。

目前, 生物制品和食品已有单独的 GMP, 但小容量的注射用药、医用气或麻醉药品的法规尚未公布。为建立特殊药品的法规, FDA 认为与其修改法规还不如先颁布一些指导和指南。因此, 对 CFR21 条 211 款的内容补充了许多指导、指南和政策适应性指导^[4~11], 然而, 出自生物评价研究中心 (CSER) 和药品评价研究中心 (CDER) 的指导和指南是有某些不同的, 而政策指南有时脱离公司的 cGMP 状态, 由现场检查员来解释。

由于发布法规的修改版需要一定的时间, 所以可以理解大家更倾向于在指导指南和政策适应性指南下工作。现行 GMP 法规为在美国销售产品的制药企业应所接受的现行生产和控制规范。虽然 cGMP 规范并不强制适用于外国, 虽然 cGMP 规范在某些国家并不强制适用, 但在美国 FDA 对国外产品的检查是依照现行 GMP 法规的, 这是美国进口和销售产品的关键。

FDA 要求每两年对企业的 cGMP 执行情况进行检查, 随着一些程序的执行, 如 1990 年执行的新药批准前检查, 检查可能会越来越频繁, 并扩展到以前未被 FDA 列入的领域如临床样品的制造。一次令人不满意的检查会延误新药的批准, 并导致 FDA 采取进一步的法规行为, 如没收和禁令现行产品。处罚可适用于个人或公司。

在 CFR21 条 211 款中规定的 GMP 规范也应用于药物和临床产品。所颁布的指导和指南是对与药物和研究药品生产有关的 CFR21 条 211 款的 FDA 的解释, 强调该机构

理解的 cGMP 是可行的^[12,13]。通过发布行业指南, FDA 已加强了药品注册者与活性药用成分生产之间的联系^[14~16]。最近, FDA 已发布了活性药物成分的“制造、加工和储存的优良制造规范”的指南草案^[17], 这些 cGMP 法规草案的最终定稿正在编成指南, 这个指南将通过人用药品注册技术要求国际协调会议 (ICH) 协调, 活性药用成分的指南将标准化并由美国、欧盟和日本的制造者共同执行^[18] (注: 活性药用成分也称为药物和药用化学原料)。

针对成品制剂的现行优良制造规范的状态如下:

210.1 (a) 在本部分及 CFR21 条 211~226 部分中要求的法规是使用的方法及在药品生产、加工、包装或储存中使用的现行优良制造规范及使用的设施或控制的最低标准, 以保证该药品符合联邦食品、药品及化妆品法对安全性的要求, 具有均一性和效价 (或含量) 并符合或代表其具有的质量及纯度等特征。

(b) 凡是在药品生产、加工、包装或储存过程中存在任何不符合本部分及 CFR21 条 211~226 部分中要求的法规的药品, 依据联邦食品、药品及化妆品法 501 (a) (2) (B), 该药应视为劣药, 并且该药物以及导致该事故发生的责任人应受相应的法规的起诉。

针对最终制剂的现行优良制造规范的适用性如下:

210.2 (a) 本部分及 CFR21 条 211~226 适用于普通药品、CFR21 条 600~680 适用于人用生物制品, 除非另有明确规定, 否则上述两者之间应该是相互补充而不是相互取代。如有上述两部分的法规不适用的药品, 则可用特定的具体法规来替代。

(b) 如果一个人从事的工作是受制于本部分、211~226 部分和本章 600~680 部分, 无其他的, 那么该人仅需遵守他/她自己所从事业务适用的法规。

本章综述了 CFR21 条 211 款适用于成品制剂的现行优良制造规范, 标题 600~680 部分适用于生物制品, 除非另有明确的规定, 否则上述两者之间是相互补充而不是相互取代。所有药品的优良制造规范的关注点都是质量控制部门, 它有权力和职责来批准或拒绝所有的成分、药品容器、密封件、中间体、成品和生产及控制文件。“质量控制部门”是指由公司指派的任何人或组织, 对质量控制负责, 随后, 本文后面有对 211 款中专门章节的总结和描述。

本章并不要重复全部 GMP 规范, 但为了强调, 引用了某些部分。

子部分 A: 总则

这一部分是 210 款的补充, 是 211 款中更详尽和具体



规范的介绍,它确立了 GMP 的框架,对 210 款的术语进行了定义。

子部分 B: 组织和人员

1. 211. 22 质量控制部门的职责

(a) 本部门有批准和拒收所有成分、药品包装容器、密封件、中间体、包装材料、标签及药品的职责与权力。具有复查生产记录的权力,保证不产生差错,或若发生差错,保证进行充分调查。本部门负责根据合同,批准或拒收由其他公司生产、加工、包装或储存的药品。

(b) 质控部门有足够的实验设施用于试验以批准(或拒收)各种成分、药品容器、密封件、包装材料及药品。

(c) 本部门有批准或驳回影响药品的均一性、效价或含量、质量及纯度的所有程序或规格标准的职责。

(d) 适用于本部门的职责与程序,应成文字材料,并应遵循。

这一部分的目的是确保在组织机构中有这样的一个组,在药品进入州际商业前,它能独立地审阅和判断药品生产过程的可接受性,也包括产品本身。FDA 强调生产和质量控制部门的分开(组织机构上)。另外, FDA 认为质量控制部门上报的组织机构级别非常重要。

从法定的角度来看,首席执行官(CEO)或公司的董事长被认为是最有职责的官员,因此也就最负有责任。因此,机构被发现违反食品、药品和化妆品法,他会受到刑事起诉,最严重的违规之一就是造假,目的就是误导 FDA。因此,CEO 对确保机构中有良好资质人员和有确保质量的组织机构是负有责任的。

2. 211. 25 人员资质

这部分强调人员的培训既包括 cGMP,也包括在药品生产、加工、包装或仓储中特定职责的人员培训,以此作为提供药品具有安全性、均一性、效价或含量、质量及纯度的保证,这部分还要求应有足够的合格的人员。

(a) 每位从事药品生产、加工、包装或仓储的工作人员,应是受过培训、教育及有实践经验的或是以上任意的组合,能完成委派的各项任务。培训是在雇员的实际操作中按照现行 GMP(包括本章中的现行 GMP 条例和这些条例要求的成文程序)中涉及雇员的内容进行的。由合格人员指导,并连续多次培训,保证雇员熟悉现行 GMP 对他们的要求。

(b) 负责监督药品的生产、加工、包装或仓储工作的每一个工作人员,应受教育、培训及有经验,完成委派的各项职务。以此作为提供药品具有安全性、均一性、效价或含量、质量及纯度的保证。

(c) 有足够量执行和监督每种药品的生产、加工、包装或仓储的合格人员。

这一部分要说明的是,质量控制部门并不是唯一的对

产品质量和符合 GMP 负责的部门,因为产品质量是生产出来的,所以原材料的控制(在制造层面上)和过程控制也是重要的。

子部分 C: 厂房和设施

本节要求有足够的厂房和设施,对某些操作提供专门的区域,设计成防交叉污染的情形。包括设计与建造特征、照明、通风、空气过滤、空气加热和冷却、管件、污水和废料、洗涤和盥洗设备、卫生和维修。照明、通风、空气过滤、空气加热和冷却都必须足够,再次,足够这个词被频繁地使用。这是个人检查员和公司的解释所不同的地方。

这节也要求有卫生和设施应处于良好维护状态的书面程序,虽然维护应有规律地执行,但预防性维护与生产冲突时有发生,然而,详细的预防性维护计划仍不能放弃。

子部分 D: 设备

本节说明了设备设计、尺寸和位置,还有结构、清洁和维护,与厂房和设施相似,为生产提供适当的设备,并必须确保设备的结构材料不会与药物产生反应、无添加物或吸收药物。在 1978 年版的 GMP 中,有设备清洁和使用记录的要求,设备清洁和保养的书面程序是增加的,这些要求在通过确定时可能牵连至某一复杂问题的批次,对调查和解决问题是有帮助的。

本节也涉及自动化设备、机械化设备或电子设备,有关这节的附加内容可在政策符合性指南 7132a.07^[5]、7132a.08^[6]、7132a.11^[8]、7132a.12^[9] 和 7132a.15^[10] 中找到。7132a.15 211.68(b) 政策符合性指导要求计算机验证作为维持程序的一部分,政策符合性指南依靠经过验证的计算机系统来代替一些人工核对已被广泛接受。

子部分 E: 成分、药品容器和密封件控制

本节包括有关成分、药品容器、密封件的签收、鉴定、储存、装运、取样、检验和批准或拒绝,要求分别有书面的程序,也涉及了批准物料的使用、批准物料的复检、防止拒收物料的使用。本节中的要求指出每一个批号都要有适当的状态标识,不同状态的物料应分开储存,计算机化仓库使得消除状态标志、物理分隔在检和批准的物料成为可能,拒收物料通常单独存放。这些规范并不说明计算机系统可以在没有适当控制保证的情况下使用。

现行的 GMP 要求物料在使用前应按所有的标准进行测试或检测,然后放行,这与恒定可信的好质量记录的供应商证书的宗旨不一致。仅对工艺控制良好、可接受多批有良好记录的供应商有资格采用这样的程序。即物料可以凭供应商质量记录为依据而投入使用,即便仅仅测定了鉴别项 [211.84(d)(2)]。

本节还要求先批准入库的先用,酌情复检获准的物料和对药品容器和密封件的控制。禁止使用拒收的药品容器和密封件。

子部分 F: 生产和加工控制

本节再次关注书面程序的要求,对不符合该程序的偏差应有质量控制部门正式批准。文中涉及了投料、产量计算、设备鉴别、中间体和药品的取样和检测、生产时间的限制、微生物污染的控制和返工。

许多制药企业是使用电子装置来证实确认组分的名称或它们的代码,接受和控制数量,称量或测量,甚至对加入的成分的鉴别。在 FDA 确认和批文件电子方式这一部分中有可接受的范围,然而,这样的体系必须通过验证来接受鉴别和确认的电子方式。

本节中所要求的加工控制应以加工性能为基础,这比遵守法规中条目更重要,即对特殊制剂非常规性检测可能更适合,不必用其他更多的常规检测,这不仅要依靠工艺验证,还有设备和工艺资格的确认。另外,通过了解产品是否利于微生物的生长和生产区环境是否保持充分低的生物负荷,微生物控制的需要可以大大简化,很明显,某些产品由于其成分和最终用途的原因还是需要密切关注生产环境的。

许多公司引入了所谓的洁净区概念,对进入生产区人员有所限制,并根据产品的性质是否利于细菌的生长或是否需要无菌来选择工作服。即使产品不需灭菌或不利于细菌生长,这也可通过减少生物负荷来控制生产区环境。

返工通常会引起 FDA 的注意,这些年来,返工似乎已经减少,这不仅是受到 FDA 的压力,还因为更多的产品和工艺经过了验证和在生产过程中进行了更好的控制。然而,偶尔也会有返工的需要,当然这需要质量控制部门的授权。

涉及新药申请(NDA)或简化新药申请(ADNA)的产品,在批准注册文件中应当包括返工的规定,虽然在 NDA 或 ANDA 文件中并不总能去预见产品需要返工的所有原因,但返工的程序还是应被评价并包含在注册文件中,如果没有包含在批准注册文件中,法规会要求递交补充申请,并在销售返工批号产品前获得批准。

对某些人来说,批量可能比法规或技术事务引起更多的商业关注。然而, GMP 要求确立产量允许范围,超过产量允许范围的应进行调查,调查的要求是确定超出正常限度的产量是否是生产中问题的反映,这些问题常规检测又是不能显示的。小偏差相对不重要,只要将产量允许范围重新评估即可,该程序应定期进行。

在加工记录中设备的鉴别似乎是多余的负担,假如几台设备是交替使用的,有人可能会问这些外加文件的理由,然而,当问题发生时,必须清楚地知道哪一台设备使用过,当然通过查阅设备清洁和使用日志可以进行追溯,但有这些信息的批记录可以使得调查简单化,关于设备的各批记录信息,如压片速度,也是必需的。

子部分 G: 包装和标签控制

这部分涉及药品生产中引起很大关注的一个方面,即产品的召回,其中包括因标签错误或包装贴签混乱所致的数量增多的召回,已引起了很大的关注,详细的规定见本节下述内容。

1. 211.122 材料检查和使用标准

(f) 不同药品或同一药品不同规格禁止使用排字印刷,但排字印刷的标签用不同的尺寸、外形或颜色的除外。

(g) 如果使用切裁标签,那么包装标签操作应包含以下之一的专门控制程序:

- (1) 每个不同产品不同规格使用独立的贴签和包装线;
- (2) 使用适当的电子或电动机械设备在过程中或在完成最后操作后对标签进行 100% 的检查;
- (3) 对手工贴签,在过程中或在完成最后操作后对所有标签用人工目测逐一检查,这样的检查应是一人操作,另一人独立复核。

(h) 在生产线上用来在产品标签或盒上印鉴的印刷装置必须是被监控的,以保证所有的印刷与批记录上的一致。

2. 211.125 标签发放

211.125 节中对段落(c)已做修改,内容如下:

(c) 应核对发放的、已使用的及回收的标签量,若发现成品数量与发出的标签数量不符,差额超出根据以往操作资料预先定下的限度,则需对这些偏差按照 211.92 调查原因,如果依照 211.122 (g) (2) 对正确的标签进行 100% 的检查,切裁或滚动贴签的标签核准可以不进行。

3. 211.130 包装和标签操作

211.130 中重新编排原段落(b)、(c)和(d)作为(c)、(d)和(e),添加了(b),内容如下:

(b) 鉴定和管好那些放置在一边,尚未贴签的装有药品的容器,以免在以后贴签中有个别容器、批号或部分批号贴错标签。不需要对每个容器进行鉴定,但必须确定名称、含量、净数量和每个容器的批或控制数。

这些要求反映了电子方式使用的增加,以确保正确的贴签和对不久后将贴签的装药容器的严格控制,现行 GMP 规范中所要求的耗时操作是与标签平衡相关联的。召回和相关的调查证明除非在标签的平衡达到 100%,否则就不是确保正确贴签的有效方法。

211.132 是 1989 年 2 月 2 日修改的,描述了人用非处方药的安全包装和标签的要求,1992 年出版的政策适应性指南 7132a.17^[11]描述了标准化的安全包装的要求。这节还涉及了免除对包装标签的要求的信息,包装标签的改变应符合已被批准的新药申请的非处方药(OTC)的要求,根据章节 314.70 (c) 所提供,可在 FDA 批准前实施,根据章节 314.70 (b),胶囊密封的生产改进需 FDA 先批准。



211.132 中声明本部分对章节 310.3^[1]中规定的特殊包装(儿童安全包装)无要求,但必须符合 1970 年毒物保护包装条例的要求。

子部分 G 包括了药品检查和有效期,在章节 211.137 所要求的有效期与 CFR21 条 211.166 中描述的药品稳定性研究相联系,要求与储存条件相关联的有效期标在标签上。

此外,适当的有效期是通过稳定性实验、在一定的条件下用市售包装及足够量的批次的程序来确定的。FDA 已出版了关于稳定性实验的指南,指南中叙述了建立稳定性研究程序的更多细节以确定产品的有效期^[4a,4b,7]。FDA 在 1998 年出版新的稳定性实验指南草案,但最后定案的讨论仍在进行中。

子部分 H: 储存和销售

这部分包括了仓库储存和销售,在质量控制部门放行前药品待检隔离的程序,在适当条件下药品的储存,确保最早批准入库的药品先销售的程序和每批药品销售记录的系统。这是另一个计算机系统广泛使用的领域,在 FDA 的检查中包括了对任何计算机化的系统和控制验证的评估。

子部分 I: 实验室控制

整个章节都涉及关于放行销售前药品和其成分的测试要求,本章还包含了稳定性实验和特殊测定,包括若一非青霉素药品有可能被青霉素药品和实验室动物交叉污染,此非青霉素药品应进行青霉素的检测,另外的信息可从良好实验室规范 CFR21 条 58 中得到。

活性成分和药品都需要留样,详情见 211.170。本章中对留样要求每年至少目检留样一次,检查其有无变质。

测试要求的基础是需要经验证过的检测方法,已确定并用文件证明其准确性、灵敏度、专一性和重复性,必须有满足统计学质量的控制标准的取样和检测计划,对取样操作的判定必须根据工艺控制的质量或提供原材料、药物或包装成分的供应商的可信度。

子部分 J: 记录和报告

本章中详述了对药品、其组分及加工药品中所用设备所必需的记录和报告。通过这些记录,一个批的完整的过程能被追溯,这些记录包括了设备清洗和使用日志,成分、容器、密封件和标签记录,主要生产和控制记录,产品记录复查,实验室记录,销售记录和投诉档案。由于这些保存记录的数量是巨大的,本章 211.180 (d) 中允许采用缩微胶卷、缩微单片或其他有效精确的复制原始记录件进行保存,许多公司对批记录和分析记录使用电子化方式,在 FDA 检查时应能方便地找到所有上述记录,但重要的是,此外本法应补充适当的程序以确保在长时间后记录不丢失,且当用于产生记录的计算机系统已修改或替换时,这些记

录能重新找回。

本章要求对每一个产品有主要的生产和控制记录。从中产生了批生产和控制记录,这些记录包括了有关该批生产以及注意点的全部指令。在药品进入州际商业销售前,所有生产和控制记录必须经过审查,如果存在差异或任一批号或其中任一成分不能符合其规格,就必须进行调查并写出书面报告,这种调查应扩展到同一药品的别的批号或与此具体的不合格或差异相联系的其他药品。

这章中的另一部分是投诉档案,这在 FDA 是例行审查的。事实上,如果 FDA 直接收到来自药剂师的投诉,投诉档案的审查可能是唯一的检查理由,有时即使公司未收到投诉人的投诉,FDA 也会因收到投诉而拜访一家公司。公司收到了投诉,就必须进行评估并对投诉人做出反应,进行调查和迅速对市面上的产品或批号采取行动。

子部分 K: 退回的药品和回收处理

这章要求对退回的药品包括最终的处理应保持大量的记录,此外,如果药品退回的原因牵连到了别的批号,应依照 211.192 进行调查。但在不良储存条件下的药品不准回收,如果对该药品是否受不良条件影响有疑问,则只有在实验室完全证实符合均一性、含量、质量和纯度标准时才可进行回收药品工作。另外,一个前提是药品及其有关的包装不是因遭受天灾或事故等不恰当储存条件。可以理解,对回收有如此严格的要求,回收材料的价值值得考虑。

结论

为符合 cGMP 要求,公司内有责任的员工充分了解其他公司遵循的规范,FDA 检查员调查了许多公司,对现行生产和控制规范有了充分的了解,应该说,现行优良制造规范是一门艺术,经常在变化中。为了要符合它,公司必须定期地回顾它们的程序和体系,必要时进行修改。

参考文献

1. Vickory, H.; Nally, L. Good Manufacturing Practices: An Overview. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1993; 7, 109—120.
2. Berry, I. R., Nash, R. A., Eds. Pharmaceutical Process Validation; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1993.
3. Code of Federal Regulations; Title 21, Parts 210 and 211, U. S. Government Printing Office; Washington, DC, 1999.
4. Compliance Policy Guides, Requirements for Expiration Dating and Stability Testing (1995). 7132a. 04.
5. Compliance Policy Guides; Computerized Drug Processing; Input/Output Checking, 1987; 7132a. 07.
6. Compliance Policy Guides; Computerized Drug Process-

- ing; Identification of "Persons" on Batch Production and Control Records, 1987; 7132a. 08.
7. Compliance Policy Guides; Lack of Expiration Date or Stability Data, 1995; 7132a. 10.
8. Compliance Policy Guides; Computerized Drug Processing; CGMP Applicability to Hardware and Software, 1987; 7132a. 11.
9. Compliance Policy Guides; Computerized Drug Processing; Vendor Responsibility, 1987; 7132a. 12.
10. Compliance Policy Guides; Computerized Drug Processing; Source Code for Process Control Application Programs, 1987; 7132a. 15.
11. Tamper-Resistant Packaging Requirements for Certain Over-the-Counter (OTC) Human Drug Products. 1992, 7132a. 17.
12. Berry, I. R.; Harpaz, D., Eds.; Validation of Bulk Pharmaceutical Chemicals, 1st Ed.; Interpharm Press; Buffalo Grove, IL, 1997.
13. Berry, I. R.; Harpaz, D. Eds.; Validation of Active Pharmaceutical Ingredients, 2nd Ed.; Interpharm Press; Englewood, CO, 2000.
14. Guide to Inspections of Bulk Pharmaceutical Chemicals; U. S. Government Printing Office; Washington, DC, 1991.
15. Guide to Inspections of Sterile Drug Substance Manufacturers; U. S. Government Printing Office; Washington, DC, 1994.
16. Guide to Inspections of Foreign Pharmaceutical Manufacturers; U. S. Government Printing Office; Washington, DC, 1996.
17. Guidance for Industry; Manufacturing, Processing, or Holding Active Pharmaceutical Ingredients; U. S. Department of Health and Human Services; Rockville, MD, 1998.
18. ICH Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients Draft, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, London, UK, 2000.
19. Stability Testing of Drug Substances and Drug Products. Compliance Policy Guides; Draft Guidance U. S. Department of Health and Human Services; Rockville, MD, 1998.

(傅 氏 译)



Y

药品中的顶空氧分析

Allen C. Templeton

Robert A. Reed

Merck&Co., Inc., West Point, Pennsylvania, U. S. A.

引言

目前,关于药物制剂中主药氧化化学降解的报道较多^[1]。虽然药物与游离氧之间的具体反应过程还没有得到完全了解,但总的来说,反应遵循下列自氧化过程^[1,2]:

引发: $\text{RH} \longrightarrow \text{R} \cdot$

增长: $\text{R} \cdot + \text{O}_2 \longrightarrow \text{ROO} \cdot$

$\text{ROO} \cdot + \text{RH} \longrightarrow \text{ROOH} + \text{R} \cdot$

终止: $\text{ROO} \cdot \longrightarrow \text{分子产物}$

注意,在上述反应中,氧分子不但参与了反应的增长阶段,而且也是促使制剂中药物氧化降解的催化反应的必要组成部分。

制剂中活性药物的氧化降解常常导致药效下降,同时可能缩短制剂的有效期^[2]。药物的氧化降解程度一方面与其结构是否容易发生自氧化成比例,另一方面也与储存(反应)条件如温度、湿度、氧气浓度和时间等有关。此外,氧化过程的其他有害效应还包括产品变色、溶出速率/溶出曲线变化、沉淀或产生异味等^[1]。更重要的是,在产品储藏中产生的氧化降解产物可能有不利的药理性性质,其中包括与毒性或副作用相关的产物。

除了药物成品在储存期间发生氧化降解之外,对于那些易氧化的药物,在生产过程中的氧化是一个重要的挑战。这种效应对于那些在溶液和(或)混悬液状态下生产单元操作的制剂特别明显。在这些情况下,在关键步骤中,需要注意尽量减少或避免暴露于氧气中。在注射用药物的生产过程中,长期以来采用惰性气体驱除以降低氧浓度,以及用惰性气体覆盖工艺容器的方法。除了在关键生产步骤(比如在药物混合和冻干前的溶液保存过程)中驱除氧外,对于易氧化的注射用药物,其成品通常填充惰性气体进行包装。只要能在包装过程中排除自动氧化链中的两个关键反应物之一,就可以提高产品的稳定性,使产品质量达到规定要求。在惰性气体环境下包装易氧化成品称为改进气体环境包装法(modified atmosphere packaging, MAP),这种包装法广泛应用于易氧化商品的生产,以提高成品的稳定性,包括食品和医药设备。虽然 MAP 主要用于制药工业的注射剂方面,但对于固体制剂在降低氧含量的环境中包装的例子却很少。

随着口服剂型的发展,口服制剂,特别是易氧化药物,常常采用与 MAP 相仿的“智能”包装方法,以保证关键药物以高质量、稳定和方便的形式使用。此外,通过处方和包装成功整合以稳定化合物,还可以缩短药物的开发周期。

因此,使用 MAP 进行固体药物制剂包装应该提到日程上来。易氧化药物成功地进行 MAP 包装应当注意以下几个关键点:①采用氧阻隔性好的包装;②混入的惰性气流应与包装线的速度一致;③选择一种合适的惰性气体,如氩气、氮气、二氧化碳等;④在一系列药物包装设备下,能够建立快速测定从小包装体积(小于 1mL)到大包装体积(1mL 到几升)的顶空氧气残留量的方法。

顶空测定的分析步骤

快速、灵敏地监测顶空氧气浓度将有利于 MAP 在以上几个方面的发展和应用,并有利于包装研究和开发、工艺开发和产品质量保证等阶段。在包装研究和开发方面,稳定的氧气测定法能实时筛选包装系统的适应性,包括容器的所有部件和瓶塞,有利于 MAP 包装的应用。最明显的例子是收集包装系统在常规和加速储存条件下的氧气进入情况,试验数据可以用来建立每个关键包装系统部件的预测模型,以支持未来的 MAP 开发项目。对于生产工艺的开发、规模扩大和生产工艺验证,快速准确地测定氧含量,能在实现并保持足够低氧气量的前提下达到最大包装速率。最后,提供质量保证或控制的工具(在线或离线)能确保包装容器内顶空部分惰性气体中的氧含量低于预先规定的标准。此外,评价容器的密封完整性也可以用其他补充的可替代的方法,如基于无菌测定的微生物或染料进入容器的方法。

在医药行业中,快速准确地测定不同包装中的顶空氧含量给人们提出了很多独特的分析挑战,单一的检测技术不能解决。本章的目的是为药品包装应用中,包装材料的研发技术人员和实验室分析人员提供可选择的各种检测方法的基础知识。本章按检测技术组织,简要介绍其检测原理,并探讨其在药品包装中的应用。

顶空氧分析技术综述

1. 顶空气相色谱(GC)

1.1 操作原理

在药学研究实验室中,如果遇到需要分析顶空样品的问题时,通常首先想到的可能是久经考验的顶空气相技术。这是因为该技术具有近 40 年在理论和实验方面探索所积累的大量知识^[3]。顶空气相技术作为解决分析问题的工具固

然重要,该技术已广泛超出氧分析的领域,但其中存在的许多问题常可用更时髦的技术,得到与顶空法相似或更好的结果。以下叙述只是对顶空气相分析做粗略浏览,更详细的叙述可参考该领域的文献^[9]。

本质而言,气相是研究挥发性化合物的技术,图1为配备分流进样口和毛细管柱的常见气相色谱仪组成部件的方块示意图。对于顶空进样,气态样品被注射进入一种称为流动相或者载气的惰性流动气体中。

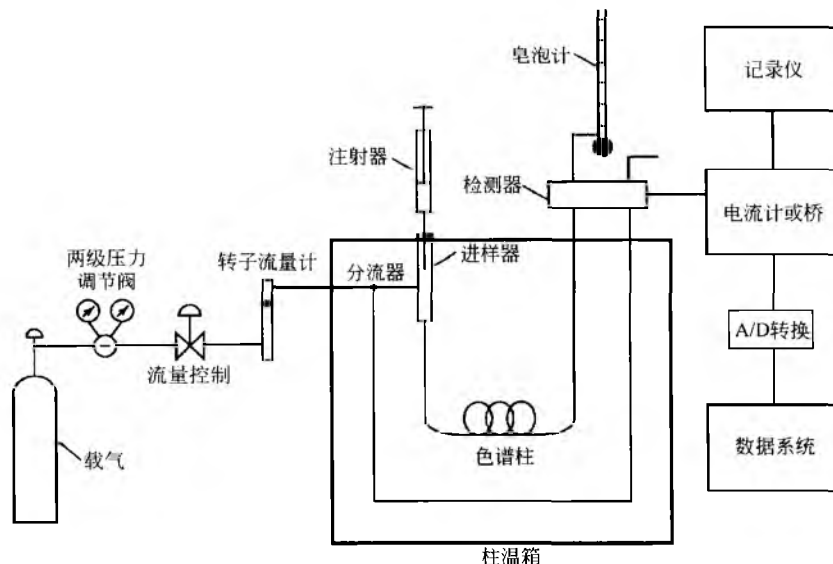


图1 常见气相色谱仪组成部件的方块示意图^[12]

流动相将样品带入固定相中,通过在固定相与流动相间的选择性分配实现样品中各组分的分离。样品注入至检测器出峰之间的时间称为保留时间(t_r),是其自身性质的反映。所得色谱图中组分相应的峰面积与其在样品中的浓度成正比,以检测响应因子相关连。分析药品的顶空氧时,从药品包装的顶空部分取样(数十微升),可用气密的注射器将部分顶空样品抽出,或是通过GC自动进样器将载气压入容器中来替换等量的顶空部分样品。无论采用何种方法,都是意味着静态模式顶空取样,而目的是取平衡状态的顶空样。

图2为实验室空气的样品色谱图,采用多孔毛细管色谱柱和热导检测器测定顶空氧。在任何一种色谱分析中,选择合适的、能分离混合气体样品的色谱柱是很关键的。在这个例子中,采用一种商品化的薄膜多孔层开口(PLOT)毛细管柱,它由涂渍一层 $50\mu\text{m}$ 厚的均匀硅酸盐分子筛膜的熔融石英毛细管组成,可在10min的分析时间内将氧气从空气样品中的氩气和氮气中分离出来。分离模式基于分析物分子或原子的大小,洗脱顺序依次为氮气、氧气和氩气。氧气的净面积和百分面积可由下式计算得到:

$$\text{Area}_{\text{Net},x} = \frac{\lambda_{\text{He}} - \lambda_x}{\lambda_{\text{He}}} \times \text{Area}_{\text{Raw},x}$$

$$\text{Area}_{\text{Net},x}(\%) = \frac{\text{Area}_{\text{Net},x}}{\text{Area}_{\text{Net},\text{氩气}} + \text{Area}_{\text{Net},\text{氮气}} + \text{Area}_{\text{Net},\text{氧气}}} \times 100\%$$

式中: x 为氩气、氮气或氧气; $\text{Area}_{\text{Raw},x}$ 为 x 的原始峰面积($\mu\text{V} \cdot \text{s}$); $\text{Area}_{\text{Net},x}$ 为转换后 x 的净峰面积; λ_{He} 为氦气的传导率 [$154.6\text{W}/(\text{m} \cdot \text{K})$]; λ_x 为氩气 [$17.8\text{W}/(\text{m} \cdot \text{K})$]、氮气 [$25.9\text{W}/(\text{m} \cdot \text{K})$] 和氧气 [$26.2\text{W}/(\text{m} \cdot \text{K})$] 的传

导率。

对于GC或其他技术中使用的注射器取样方法来说,存在一个潜在的缺点,即潜在污染。污染的来源有以下几个方面:①样品移取时包装发生泄漏;②注射器从包装中移取样品到仪器时发生泄漏;③样品进入仪器时隔膜处发生泄漏;④注射管中残留气体引起的污染,注射器中的残留气体污染与注射管的体积直接相关。

1.2 应用

使用顶空气相法分析药物包装和样品中的氧具有很多优势,例如,仪器很普遍,分析者比较熟悉。当样品容器的大小合适时,使用商品化的顶空气相自动进样系统分析大批样品非常方便。自动进样器的样品瓶大小不一定适合某些常用药物的包装大小,因此自动进样器的使用仅限于少量的大小合适的样品,或能转移到顶空自动进样小瓶中的样品,后者会影响很多研究的目的。利用气密性注射管手动吸取和进样还会遇到更多的问题,例如,样品在真空下会因为空气的压力平衡而稀释样品,造成氧测得值偏高。因此,使用气密性注射器时应当非常小心,必要时采取如上所述的适当措施加以控制。此外,在从包装中取样的过程中,也要注意不要让周围空气漏进来,在穿刺样品前可用自黏附的橡胶隔膜作为预防措施,如穿刺铝箔(铝箔用于HDPE瓶的封口)。用橡胶塞密封的样品,可以为取样提供一个较好的预防泄漏的屏障。对于所有破坏性顶空氧分析方法而言,取样是一个普遍的问题,使得定量分析少量气体样品且避免空气的污染是很困难的。虽然样品移取中存在一些问题,但顶空气相只需少量体积的样品绝对量

(数十微升),使得静态顶空氧分析成为有吸引力的和有效的各种药品包装种类/尺寸的分析方法。当样品进入色谱系统后,该技术分析氧的主要局限是需要较长的分离步骤(最好数分钟)以选择性分析氧,并且还要分析标准品,以

及通过分析一系列样品以证明系统的适应性。最后,虽然传统气相色谱仪不能用于实时监测,但是目前便携式(微型)气相色谱单元的商业化开发使在线取样成为可能。

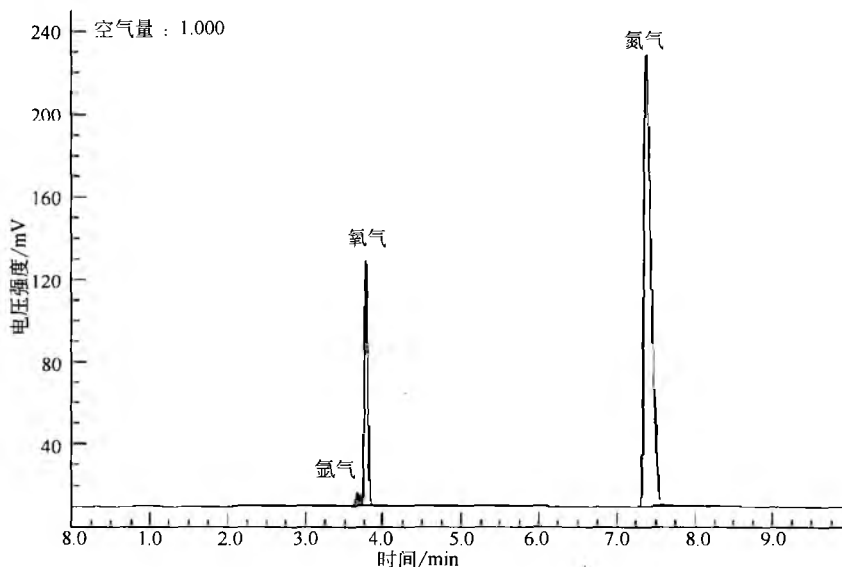


图2 GC法测定某一样品顶空氧的色谱图

使用 PLOT 分子筛色谱柱和热导检测器。色谱条件: 载气: 氦气 (2mL/min); 柱温: 26℃; 进样口温度: 160℃; 分流模式: 分流比 10:1, 分流流速 20mL/min; 进样器: 160℃; 运行时间: 10min; TCD 检测器温度 160℃^[12]。

微型气相色谱仪的工作原理与常规顶空气相分析仪一样,主要不同的是体积和所需样品量。该仪器将微型进样器、色谱柱和检测器集成在一个模块或通道上。样品通过连在模块终端的内置隔膜泵从进口注入。因为进样管体积小且仪器部件微型化,使分析体积控制在数十微升内,分析时间少于 1min。因此,微型气相色谱仪可以克服传统顶空气相色谱仪在分析时间上的不足。此外,另外一个显著的优点是微型气相色谱仪通常有两个通道,允许同时分析两种顶空样品(如氧气和水分)。

2. 电化学法

2.1 操作原理

从科学和商业的观点看,使用电化学法进行氧分析也有着悠久的历史过程。大部分商业化电化学顶空氧分析仪的操作原理是使用固态氧化锆离子选择性电极^[4]。在这种电极中,随着温度升高(>400℃),氧离子能够迁移到氧化锆陶瓷晶格结构缺陷位点上。早在 Nernst 时代(1899年),人们就开始知道:当气体在电极膜两侧的浓度不一致时,会产生可测量的电势差(E')。如果膜一侧处于已知浓度 $[O_2]_{REF}$ 的参比氧气中,那么未知浓度 $[O_2]_{UNK}$ 氧气与参比氧气之间产生的电位差将与膜两侧氧浓度成比例,如 Nernst 方程所示^[4]:

$$E = \frac{RT}{nF} \ln \frac{[O_2]_{REF}}{[O_2]_{UNK}}$$

式中: E 为电位, V; R 为摩尔气体常量; T 为温度, K; n 为转移的电子数^[4]; F 为 Faraday 常量, J/mV。

在实际应用中,测量步骤包括刺破包装,吸取(通常通过一个小隔膜泵)2~4mL 的顶空气体,冲洗包含电极的小池,接着在其中分析。分析过程非常迅速,通常为 5s,更重要的是,测量不受湿度的负面影响,但也需注意不要将分析仪暴露在液态试样里,否则传感电极将会损坏。商业分析仪能够同时测量顶空氧和二氧化碳,通过附加部件,可用于多种包装容器和试样类型(如铝罐、啤酒瓶等)的测试。此外,还有一类在平面金电极上以氧直接还原反应为基础的商业电化学氧分析技术(Clark 技术或以后的改良技术)。后者被证明对特定的顶空氧分析问题是很有用的,如在生产操作过程中监测氧。

2.2 应用

电化学方法所需的样品体积限制了其只能应用于顶空体积 ≥ 2 mL 的较大的药品包装上,如 HDPE 瓶、玻璃瓶和水泡眼包装。仪器的结实性和易用性使该技术特别适合在生产环境中使用。

3. 调频光谱 (FMS)

3.1 操作原理

最近 FMS 商业化用于包装检测,作为一种高灵敏的激光吸收技术,在透光容器中气体浓度的非破坏性监测方面

非常有用^[5~8]。氧气吸收带位于近红外的 762nm 波长处, 对于使用不连续白色光源的典型近红外光谱仪, 该波长处氧吸收的测定, 由于低频光强度的波动, 不能提供顶空氧检测所需的灵敏度。然而, 采用激光光源和调频检测技术, 信噪比可以大幅提高到 100~10 000 倍。此外, 将可调谐激光器用射频振荡器调制后, 检测带宽向高频移动, 这样减少了低频检测特有的强度波动。

通过将射频振荡 (Ω) 叠加到调制二极管激光器频率而进行测量。调频二极管激光器的光谱输出包括载体频率 (ω_c) 和边带频率 ($\omega_c \pm \Omega$) (图 3)。当激光扫描经过氧的吸收波长时, 光吸收量与气体浓度成正比, 通过记录两个边带之间的吸收差值将其“写入”边带频率中。吸收值的差

异信息可以用相敏感检测技术加以恢复, 图 4 为解调的吸收谱线图。光吸收量与氧浓度成正比。气体密度 n 通过 Beer 定律与峰-峰信号强度 ΔI 相关, 对于弱吸收分子, 可以写成

$$n = (\Delta I \Gamma \pi / I_0 S x) \text{ cm}^{-3}$$

式中: ΔI 为通过容器后光强度的变化值, W/cm^2 ; Γ 为最大吸收信号一半处的完全宽度, cm^{-1} ; π 为一常数; I_0 为入射激光强度, W/cm^2 ; S 为总吸收横切面, cm^2/cm ; x 为容器直径, cm 。样品瓶的测定密度与标准值对比, 用浓度 (%) 表示。

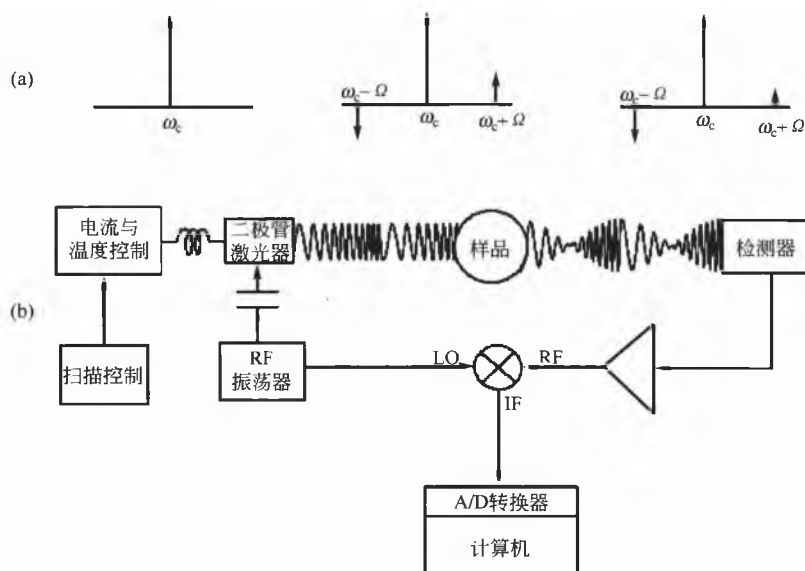


图 3 (a) 二极管激光束的频率和强度图形。从左向右依次为: 未调制的、已调制无吸收的、通过上方边带调制有吸收的。(b) FMS 的仪器示意图。当频率调制二极管激光输出通过气体样品, 在特定波长处产生吸收后转变为调制振幅。调制振幅与气体浓度成正比, 能够相敏检测, 与氧气浓度有关^[12]

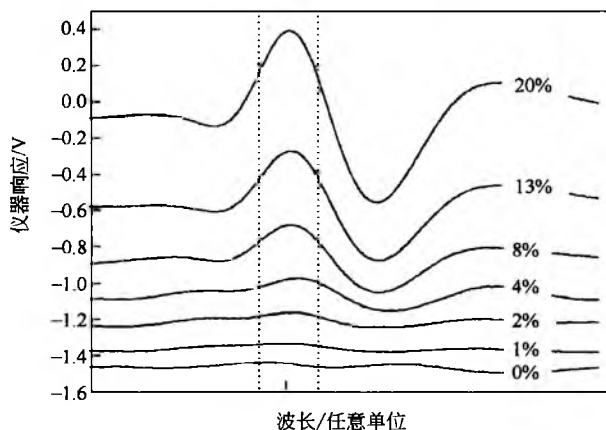


图 4 来源于氧吸收的调频信号^[12]。每个光谱峰的振幅与氧浓度成正比 (注意每次扫描的右侧)

3.2 应用

这项技术的应用限于包装中的顶空监测, 这些包装是光学透明的 (玻璃小瓶, 安瓿, 玻璃瓶, 包括琥珀色玻璃容器), 或者是半透明的 (LDPE, 但不是 HDPE 包装)。其他具有不同光学密度和透光特性的容器也有可能用于采样, 但需要逐个进行评估。包装可以插入池容积为 1~100mL 的样品架中, 通常池长度为 1~3cm。

这种方法的主要优点是能够非破坏性分析密闭容器中的氧含量, 样品不会发生变化。因此, 可以用单一一包装在不同储存条件下按指定的时间间隔研究其中的氧气浓度曲线, 而不需要破坏性地插入探针或取出顶空氧进行分析。从样品的绝对用量、样品准备时间和样品之间的差异而言, 该技术均极具价值。从质量保证的角度看, 采用无损分析方法, 可以节约大量的成本。对于一些注射剂, 开发完全监测其顶空氧含量的在线仪器的价值也极其重要。

4. 荧光猝灭法

4.1 操作原理

基于发光猝灭的氧气传感技术也是一种相对新型的商业开发, 这项技术的科学基础在最近的一些综述文献中得到详尽描述^[9]。本节的目的简单介绍这种氧气测定技术,

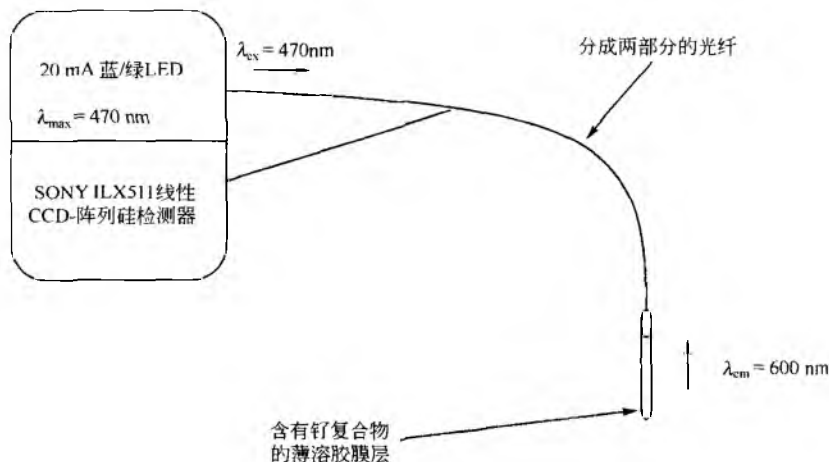


图5 基于荧光猝灭的顶空氧分析仪示意图^[12]

发光猝灭传感器可以用以下过程进行解释, 其中 M 代表发光分子、Q 代表猝灭体:

光子吸收 (I_a) $M + h\nu \longrightarrow M^*$

发光 (k_r) $M^* \longrightarrow M + h\nu$

非辐射衰变 (k_{nr}) $M^* \longrightarrow M + \Delta$

动态猝灭 (k_q) $M^* + Q \longrightarrow M + Q^*$

猝灭体耗尽激发态分子 (M^*) 的量, 因此降低了发光发射的强度, 或者缩短了衰变周期。在商业氧传感器中, M 为显荧光的钌染料, 荧光强度通过氧气以常说的“动态荧光猝灭”方式实现猝灭。根据以上过程, 氧分子 Q 与处于激发态的荧光团 (M^*) 之间的碰撞导致了非辐射能量转移, 荧光强度损失。

根据简化的 Stern-Volmer 方程, 荧光强度的猝灭量能够与样品中氧气的局部压力定量相关^[9]:

$$I_0/I = 1 + Kp_{O_2}$$

式中: I 为猝灭的荧光信号强度; I_0 为未猝灭的荧光信号强度; K 为猝灭常数, 与使用的特定荧光团 M 和氧气的局部分压 p_{O_2} 有关。

Stern-Volmer 方程的扩展形式包含了这些对应项的因子扩展, 也可以一种更准确的方式将 I_0 与氧水平关联。标准操作至少包括: 对一系列氧浓度进行每日校正 (在固定温度和压力下), 使用测得的校正系数测定未知样品中的氧含量。

在常规的操作条件下, 传感器会发生衰退, 因此必须经常重新校正。特别对于那些新传感器, 在获得稳定操作之前可能需要数小时的活化。在测定过程中, 也需要将探

读者可以参考更专业的文献以获得更详细的知识。在一种商业装置中 (见图 5 的示意图), 通过使用一种分成两部分的光纤将激发光源从蓝/绿 LED (最大波长 470nm) 传输到位于光纤顶端的薄膜涂层, 使用荧光测定氧的局部压力。分散在薄膜内的钌复合物被激发, 在 600nm 处产生最大荧光发射, 在顶端被采集并送至 CCD 检测器。检测到的荧光强度与液态或气态样品中的氧的量成反比。

针插入样品瓶中, 等待一定时间, 使传感器对顶空环境达到平衡。平衡时间与传感器顶端用于排除周围光的保护套中的化学成分 (当前研究使用 Teflon[®] AF 涂层) 有关。众所周知, 荧光猝灭的准确度受分辨率 (随机噪声)、对 Stern-Volmer 方程的偏离和校正误差等限制^[9]。所有这些因素都可以引起测定的不准确性。

4.2 应用

由于荧光猝灭检测器不消耗顶空氧, 所以可以制成微型检测器来检测很小容积的样品。然而, 这项技术还是有破坏性, 因为检测时仍需将 300 μ m 的探头插入包装与相关的顶空部分接触, 目前最小的有效检测体积为 100 μ L。该技术的优点如下: ①快速, 检测时间为 5s~2min, 时间长短主要取决于样品顶空氧与感应膜达到平衡所需的时间; ②所需样品体积很小 (约 100 μ L), 主要由探头的接触大小决定; ③成本低, 仪器小。所需样品体积非常小, 使其成为可用于快速分析药品包装泡罩内的氧气的设备之一 (另一种是气相色谱)。体积小和易安装也使这种设备在便携性和在线包装检测方面具有相当大的吸引力。此外, 荧光猝灭设备也可实现多通道同时检测多份样品, 软件的数据登录部分允许程序化地按一定时间间隔测定。

应用该技术时需要注意各种限制。当温度变化时, 荧光猝灭浓度也会发生变化, 所以校正时应注意温度范围。温度会影响荧光衰减时间和荧光团与氧气的碰撞概率。需要将样品温度保持在 $\pm 1^\circ\text{C}$, 或者在测定的同时也测定温度, 因而影响该方法的实用性。本章作者的实验室经验表明, 对于任何探头, 更长的积分时间可使探头信号强度高

于背景信号。响应因子降低可能由于钨染料随时间发生变化(如降解)。需要更高的信号强度和(或)低的噪声,因为 S/N 值与积分时间的平方根成正比。另外,从 Stern-Volmer 方程可以看出,在低氧气浓度下,信号强度猝灭变化的速率最大。进一步开发氧特异检测仪器将会大大推动该技术的应用。

5. 四极杆质谱分析仪

5.1 操作原理

四极杆质量分析器是目前使用最普遍的质谱检测仪,这方面的参考文献很多^[10,11]。四极杆质谱仪常被比喻为质量过滤器,因为其可以调整到让质荷比很窄的离子通过。图6为通用四极杆质谱仪的示意图。典型的四极杆质谱仪

通过在四个圆柱形杆上施加静态的和射频电场以区分不同质量的离子。顶空气体样品通过进口进入离子源,在其中由灯丝发射的电子离子化。样品离子在电场中加速,最后射入到四极杆中心的开口处。在最简单的系统中,一对杆连接于直流电源的正极,余下一对连接于相同电源的负极。再给每对连于直流电源的杆施加可变的相差为 180° 的射频电场。为了使离子通过四极杆到达检测器,离子必须在这些外加的电场中具有稳定的轨道,如 Mathieu 方程描述的离子在电场中的运动。简单地说,这就需要施加各种特定电压作用于四极杆上,以筛选所需的质量和 m/z 范围。通常通过从0到预定的最大值扫描射频电场和直流电压,但保持恒定的比值,从而目标离子到达检测器的质谱记录在 Faraday 杯状检测器中。

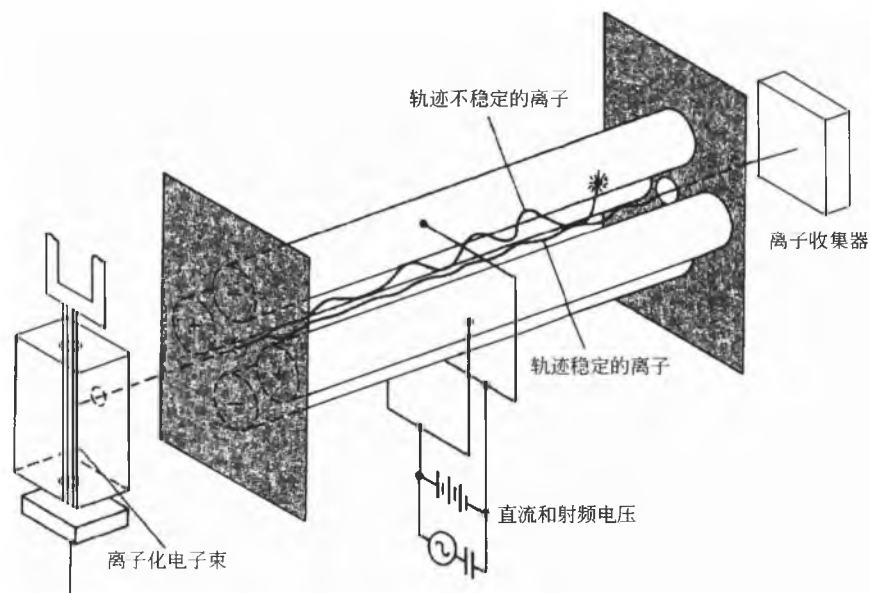


图6 四极杆质谱仪的断面示意图^[12]

5.2 应用

在半导体行业中,应用四极杆质谱仪测定残留气体已经有较长时间,这些行业需要检测和控制各种超真空容器残留的污染气体量。在制药行业中,应用四极杆质谱仪的优势是能够同时检测和定量许多待分析物($2 \sim 300 m/z$),而只需进行一次顶空样品。与其他破坏样品的技术相比,质谱仪的最大缺点是样品的导入。目前正在研究各种样品导入方法,以解决该问题并改进该技术的应用。在需要测定惰性气体覆盖的详细含量而不只是氧气方面,这项技术可以用于过程监控。

各种技术之间的比较

对于特定的应用选择技术的关键是评价所要的信息类型、仪器的可获得性、包装类型和所研究的样品类型。在

MAP 开发中,研究内容包括不同包装材料中的氧穿透性质、包装系统的选择、工艺开发和实施及质量保证。在评价各种包装系统时,了解从非常低的浓度($<1\%$)到大气中浓度时氧气进入或消耗的速率,问题可能会变成更直接。将实验室环境中使用的工具置于生产环境中进行工艺开发和实施时需要再评估。最后,在 QA/QC 环境中,需要考虑方法的长期耐用性、稳定性、易校正和实用性、通常分析的氧含量,以及其他实际的问题,这些都可以作为选择工具的参考依据。以下讨论中的工具选择标准主要有三点:①性能;②其他相关的技术性质;③待测包装的类型。

最近的一份研究报告对各项技术进行了比较^[12],其中的关键点总结如下:

(1) 线性。所有技术在 $0.00\% \sim 20.0\%$ 的测量范围内均具有良好的线性,且 $R^2 \geq 0.99$ 。

(2) 准确度。总的来说,大多数 MAP 程序的目的是将氧气从大气中的浓度减少至预定的浓度。通常,测定技术

Y

不要求给出容器中氧气量的绝对值,但要求充分准确显示并指出样品中氧气浓度低于目标限度,作为限度测试。因此对于测定技术,最重要的是能够测定的较低浓度(如<5%),这比能够测定的较高浓度更重要。在该研究中,对各种技术的性能的检验是以0%为标准的,比较各种技术的理论数据和具体试验获得的数据的绝对差值,并对低浓度氧气标样的预期值和观测值的偏离程度按从小到大进行排序,依次为四级杆质谱仪<电化学检测法<调频光谱法<微GC<GC<荧光猝灭法。

(3) 检测限。最低定量限可以估算或由厂家处获得。对于关键的绝对低浓度氧气的测定,定量限应建立在特定系统研究上。取样过程在氧气浓度低于2%时有很大影响,影响了数据的准确度。

熟悉指定设备的性能限制是解释一系列测试结果的关键。此外,其他因素的考虑也侧重于技术选择的。表1总结了选择合适分析仪器进行顶空氧分析时的一些其他因素,

包括分析时间、校正和使用难易、可获得性、费用、所需样品体积、进样方式等。同时,从表1可以看出,在这六种技术中,分析时间从分钟级(GC、荧光猝灭法、四级杆质谱仪)到秒级(微GC、电化学法、FMS)。尽管处于不同的开发阶段,所有设备都有商品销售,价格差异也很大,从2000美元到50 000美元不等。目前FMS和四级杆质谱仪技术是商业化开发最少的技术,在可以常规使用前还需要进行更多的研究。一个主观性很强的指标,校正和使用的难易也列在表1中,反映了作者认为培训其他操作者的相对难易程度的判断。其他的指标,如多功能性、方便携带性以及适合在生产环境中使用等,在选择仪器时也是同样重要的。例如,顶空气相、微GC和四级杆质谱仪不仅应用于顶空氧监测,还有许多其他方面的应用,可以同时获得其他信息,如水分、二氧化碳和其他挥发物质。作者所知道的唯一非破坏技术是FMS,只适用于能透过检测光束的包装类型。

表1 各种顶空氧测定技术的特点总结

仪器	分析时间	校正/使用的难易 ¹⁾	仪器可获得性	费用 ²⁾	所需样品体积	破坏性
GC	分钟	3	商业化	40+	10~30 μ L	有
μ GC	秒	2	商业化	15 000~20 000	10~30 μ L	有
电化学	秒	1	商业化	4000~10 000	1~3mL	有
荧光猝灭	分钟	3	商业化	2000~5000	无 ³⁾	有
FMS	秒	2	半商业化	35~50	无 ⁴⁾	无
四级杆 MS	分钟	3	半商业化	25~50	10~30 μ L	有

1) 1为最容易校正和使用,2为较难校正和使用,3为最难校正和使用。

2) 估计价格为美元。

3) 样品体积足够,估计在100 μ L左右,以保证探针插入,与样品接触。

4) 仪器是非破坏性的,可以使用激光可通过的小瓶。

最后,选择设备的另一途径是从需要测定氧气含量的包装种类方面考虑。为简单起见,只考虑最常用的三种药品包装:塑料瓶、安瓿和玻璃瓶、泡罩包装。

(1) 用铝箔密封的塑料瓶。使用铝箔内封的塑料瓶(如HDPE瓶)的药物包装体积一般为30mL、75mL和120mL,常用于药品包装。要快速准确地测定这种包装的顶空氧,六种技术除FMS外均可使用。电化学方法最适合于大体积包装(>2mL),并且最易于使用。这些设备的是所有设备中最结实的,也最适合于培训有限的操作人员使用。

(2) 玻璃瓶和安瓿。玻璃瓶和安瓿为另一种常用的药品包装材料,特别适用于注射剂。上述六种技术均可用于分析样品中的顶空氧,只要有足够的体积。对于这种类型的包装,FMS有相当的优势,因为它没有破坏性的。且FMS可用于灌装各种介质的泡罩,如会覆盖瓶壁的粉剂。只要部分分析光束可以穿过,该技术特有的吸收信号的差值就可以给出氧气的浓度。这种无损的、可在线100%检测包装容器顶空氧的能力使其具有吸引力。

(3) 泡罩包装。单个泡罩的小容积使其成为各种药品包装中最具挑战性的顶空氧浓度测定包装,挑战性包括两

个方面:一方面是可以取样的体积极小;另一方面是样品无污染的取出和注入。在这些技术中,适合小体积测量的顶空GC、荧光猝灭法和质谱法中,从取样角度看均存在不足。尽管在该领域需要进一步的开发,顶空GC和微GC有可能最适合,只要将自黏附的隔膜置于包装背面,手工取出一部分样品供进样用。其他的方法,包括非损伤的技术还在研究中。

结论

本章介绍了测定不同药品包装中顶空氧浓度的六种检测方法的原理,以及不同的性能指标用于评价其用于各种包装类型的合适程度。未来的研究将侧重于提高小体积样品导入技术的可靠性,也可能是开发探头技术,供遥测氧浓度用,或将小装置置于包装中,记录氧浓度的时间曲线。

参考文献

1. Johnson, D. M.; Gu, L. C. Autoxidation and Antioxidants. In Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 1st Ed.; Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; Marcel Dekker,

- Inc.; New York, 1997; Vol. 1, 415—450.
2. Connors, K. A.; Amidon, G. L.; Kennon, L. Chemical Stability of Pharmaceuticals; Wiley: New York, 1979; 80—98.
 3. Kolb, B.; Ettre, L. S. Static Headspace Gas Chromatography; Theory and Practice; Wiley: New York, 1997; 1—55.
 4. Wang, J. Analytical Electrochemistry; Wiley: New York, 2000; 350—379.
 5. Bjorklund, G. C. Frequency Modulation Spectroscopy: A New Method for Measuring Weak Absorptions and Dispersions. *Opt. Lett.* 1980, 5 (1), 15—17.
 6. Janik, G. R.; Carlisle, C. B.; Gallagher, T. F. Two-Tone Frequency-Modulation Spectroscopy. *J. Opt. Soc. Am. B* 1986, 3 (8), 1070—1074.
 7. Silver, J. A. Frequency-Modulation Spectroscopy for Trace Species Detection: Theory and Comparison Among Experimental Methods. *Appl. Opt.* 1992, 31 (6), 707—717.
 8. Cooper, D. E.; Martinelli, R. U. Near-Infrared Diode Lasers Monitor Molecular Species. *Laser Focus World* 1992, 28 (11), 133—146.
 9. Demas, J. N.; DeGraff, B. A.; Coleman, P. A. Oxygen Sensors Based on Luminescence Quenching. *Anal. Chem.* 1999, 71 (23), 793—801.
 10. Drinkwine, M. J.; Lichtman, D. Partial Pressure Analyzers and Analysis; Whetten, N. R., Long, R., Jr., Eds.; American Vacuum Society: New York, 1978; 456—479.
 11. Ferran, R. J.; Boumsellek, S. High-Pressure Effects in Miniature Arrays of Quadrupole Analyzers for Residual Gas Analysis from 10^{-9} to 10^{-2} Torr. *J. Vac. Sci. Technol. A* 1996, 14, 1258—1265.
 12. Templeton, A. C.; Han, Y.-H. R.; Mahajan, R.; Chern, R. T.; Reed, R. A. Rapid Headspace Oxygen Analysis for Pharmaceutical Packaging Applications. *Pharm. Technol.* 2002, 26 (7), 44—61.

(吴小虎 陈阳 译)



药品中的水分

R. Gary Hollenbeck

University of Maryland School of Pharmacy, Baltimore, Maryland, U. S. A.

引言

地球的 75% 由水组成^[1]，药物制剂中也含有水分。在固体剂型领域，药剂科学家多年来一直努力回答这样一些问题：固体药物中到底含有多少水？这些水是以什么形式存在的？它们是怎么影响药品或者生产工艺的？

水分，通常是指一种由未鉴别液体所引起的湿度^[2]，这里假定未鉴别的液体为水。因此，本章主要涉及固体剂型中存在的相对少量的水分的定性和水分所引起的后果。化学稳定性、晶体结构、粉末流动性、可压性、润滑性、溶出速率和聚合物膜透过性等，这些是受水分影响的药剂性质。湿法制粒、挤出、滚圆、真空干燥、冷冻干燥、喷雾干燥、流化床干燥、压片以及水性包衣等，是一些明显受到水分含量和形态影响的单元操作。

水分能够影响单个活性成分和辅料的性质，而且有必要把水分对每一单一成分的影响作为研究的第一步。事实上，本章大部分是关于一些特定化学品的吸附行为。然而制剂的行为受到单个组分特性的复杂影响。下面是一个水分非均匀分布的例子：一个含有 2% 水分的粉末混合物中含有 10% 的亲水性黏合剂。假设所有的水分与黏合剂结合，那么黏合剂本身水分含量为 20%。显微照片表明，崩解剂的存在能够明显改变水分敏感性药物存在的环境的相对湿度^[3]。尽管至少已经有一种模型能够预测混合物中水分的含量^[4]，然而在很大程度上水分在复杂的药剂处方中的分布情况是未涉足的领域。

1. 历史观点

药物制剂中含水量的研究，可以在科学上和法规上分为三个阶段。第一个阶段专一针对药物制剂中存在的或多或少的水分，这里多数药物属于天然产品，水分与药物的效力和商业价值有关。

第二阶段，认识到水能够影响药物或者制剂的物理化学性质。事实上，水可能以不同的形态存在，可以将水分分为“结合水”和“自由水”。这里，自由水或溶剂样的水与多数药物的稳定性或产品问题有关^[5]。

第三阶段，认识到即使少量的“结合水”也能很显著影响药物制剂的性质和工艺。在该领域的科学发展中，很明显水分的形态与量的多少同样重要。尽管在 Gibbs^[6] 最先的工作之后，已经把吸附物的复杂的热力学性质作为研究目标，这个阶段但由于能利用更好的新的分析手段对在分子水平进行分析而得到加强。

过去的几年中，只有极少量的研究完全把水的性质和

物理化学稳定性影响以及产品问题联系起来。最近研究表明，这样的课题仍然很重要，仍然有很多问题需要回答，热力学性质和技术应用之间的鸿沟将继续变窄。

2. 法定标准

水分测定的方法是在 USP 24/NP 19^[7] 中的最好的经典方法，但是只能测定水分含量^[8]。多数法定标准的规定是武断的，而且可能过分严格或者宽松。它们并不是以之前含水量与稳定性和性能的关系的数据为依据的。

一个美国药典水分标准的顾问小组发起修订活动^[9]，修订包括在总论〈1241〉中加入背景材料“药物制剂体系中水-固体间的相互作用”。然而，这发生在 10 年前，而且也没有随后加入可以确定水的状态的标准分析试验。

《美国药典》提供了两种测定固体中水分含量的方法：Karl Fisher 滴定法以及质量分析法（如热重分析法）。这些方法的应用、优点以及缺点会在后面讲到。多数法定标准中列出的章节为“水分”或“干燥失重（LOD）”。对于化学品来说，质量分析方法与总论〈731〉一章中“干燥失重”^[8]的物理测试相同，现在由于可能存在挥发性成分而不是水，干燥所丢失的质量不是实际的含水量。标准中包含“水分”测定，表明唯一的挥发成分是水。

水分测定的本质的最好的例证可能是《药用辅料手册》^[10] 列出 31 种不同的实验室测定水分的方法和一种测定平衡含水量的方法。在编排 148 篇各论^[10] 的时候，用这些方法评估水分含量，而其中很多测定与固体无关。

背景

约定、定义，以及术语

水分和固体作为研究目标没有用明确的定义或统一的用法进行区分。表 1 明确定义了经常误用的术语。

表 1 定义

术语	符号	定义
吸着 (sorption)		系统自发地从空气中获得组分（此处指水）
吸附 (adsorption)		吸着限于固体表面，吸水量与表面积直接成正比
吸收 (absorption)		附着的组分进入固体结构中，吸水量不取决于表面积

续表

术语	符号	定义
解吸 (desorption)		自发地失去吸着组分 (水) 至空气中
吸着剂 (sorbent)		进行吸着的物质或体系
吸附剂 (adsorbant)		表面上指进行吸附的物质, 该词不常用, 不能区别吸附和吸收
被吸附物 (adsorbate)		被附着的物质 (此处为水)
水分含量	MC, W	吸附剂中的总水量
以干重计	W_D	水分含量相对于干固体的表达式: $W_D = \text{水分质量} / \text{干固体质量}$
	$\%MC_D$	100g 干固体中的水分量: $\%MC_D = 100W_D$
以湿重计	W_w	水分含量相对于固体总质量的表达式: $W_w = \text{水分质量} / \text{样品质量}$
	$\%MC_w$	100g 样品中的水分量: $\%MC_w = 100W_w$
平衡水分含量	EMC, $\%EMC$, $W_{D,eq}$, $W_{w,eq}$	在指定温度、压力和蒸汽组成时的水分含量 (有时为百分数)
空气中的水分压	p/p_0	空气中水的蒸汽压 (p) 为相同温度下纯水的饱和蒸汽压 (p_0) 的分数
	x	水蒸气的行为通常假定为理想的 (逸度 = 压力), x 为水的活度
相对湿度	$\%RH$, $100p/p_0$, $100x$	空气中水的蒸汽压 (p), 通常以相同温度下纯水饱和蒸汽压的分数表示 (p_0)
结合水		与固体相关的水, 其蒸汽压小于 p
游离水, 未结合水		固体中水的蒸汽压大于 p , 有时称为自由水
引湿性		与吸着同意, 指获得的水的量或状态足以影响物质的理化性质
水合水		晶格中有规则位置的水, 与其他分子有特定的化学计量比

续表

术语	符号	定义
风化		自发地失去水合水, 非热引起的
潮解		充分吸着导致物质的溶解
单层容量	V_m	当表面覆盖时 STP 吸附的水的体积
	Y_m	当表面覆盖时吸附的水的量

本章将继续沿用一些约定。含水量是基于干重的。必要时, 下标 1 可用于描述水, 下标 2 可用于描述吸附剂中的其他成分; 没有下标时指水。本章收录了我实验室许多常规测试的结果, 尽管这里没有提供具体使用的实验仪器和所有的实验细节, 我们仍然努力把能够足够影响试验结果的信息列出 (如热质量分析中的加热速率)。这些数据应该被认为是测试材料的一些代表性的结果, 而不是大量材料用不同的仪器在不同实验条件测得的结果。

吸附等温线是最广泛的用于定量描述一种物质的亲水性的公式。它是恒温时的一个关系式:

$$n = f(x) \quad (1)$$

式中: n 为吸附水的摩尔数, 它是 x (一定温度下空气中水蒸气分压) 的函数。 n 对应水分含量, x 对应相对湿度, 如表 1 中定义的, 表明这种函数关系可能有多种表达方式。通常情况下, 吸附等温线的图示是一个独立变量含水量与相对湿度的关系的曲线, 两者均以百分数表示。

本章列举了一些物质在不连续的阶段吸附水分的理想吸附等温线 (例如, 晶体物质能够形成水合物), 以及在不连续的阶段与水不发生相互作用的物质^[1]的理想吸附等温线。对于能够影响固体的物理和化学性质的吸附水分的偏离和意外的结果, 这些理想的等温线可以作为一个讨论的基础。

图 1 是一个相对分子质量为 180 的假定分子的吸附等温线, 它能够形成一水合物。这种情况下, 物质在水中的溶解度假定为 50wt%, 无水物到一水合物的转变的临界湿度为 RH60%。同时假定固体在水中的溶解是理想的。

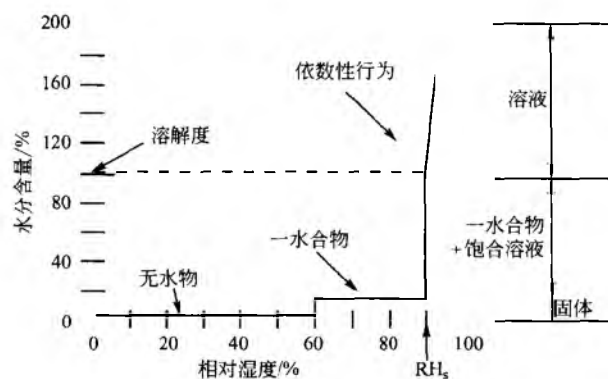


图 1 假定物质的阶梯式吸附等温线

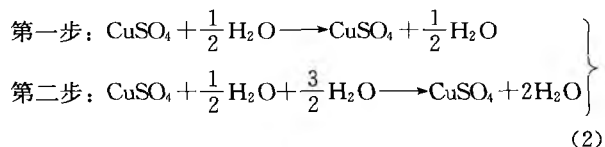
这种阶梯式的等温线是一种物质能够形成水合物的特征表现。在相对湿度低于 60%，固体含水量保持不变。当水的活度达到临界湿度（60%）时，固体吸附水，从无定形向一水合物转变。这个例子中，完全转变为一水合物的含水量为 10%（例如，1mol 水为 18g；1mol 物质为 180g）。

进一步增加湿度对含水量没有明显作用，直到水的活度与分析温度下物质在水中的饱和溶液中的活度相等。与该活度有关的相对湿度称为 RH_s 。这种情况下， $RH_s = 91\%$ 相对湿度，而溶解度为 50wt% 时 $x_2 = 0.09$ 。摩尔分数为 1 时，假定为理想溶液， $x_1 = 1 - x_2 = p_1/p_1^s$ 。在这个假定下，所有固体都溶解时的饱和溶液的水分含量是 100%；因此，在 91%RH 时一水合物从大气中吸水直到全部溶解。物质的饱和溶液能够维持恒定湿度，这成为建立湿度控制室的一个基础。

相对湿度大于 91% 时，溶液依数性行为导致水分的吸收，直到溶液与空气中水的蒸汽压平衡。在图 1 中，该区域是以 Raoult's 定律为基础的。

尽管已经给出一些具体的例子，晶体物质吸收水分的某些方面在这一点上需要注意。首先，要意识到这些系统中大量的水实际上使得水合物之间转变时含水量的细小变化不明显。例如，乳糖一水合物，“含有 5% 结晶水以及约 0.1% 的吸附水”^[10]，表明水合物会发生吸附作用。

再者，这种等温吸附是一种热力学关系。尽管它代表了平衡的位置，并没有提供关于发生转化时的速率的任何信息。例如，干燥剂硫酸钙经历水合的两个阶段如下：



第一步，有水蒸气存在时，半水合物很快形成，而第二步则需要几个星期或者几个月的时间才能完成，这取决于半水合物储存的环境湿度^[12]。

最后，临界相对湿度取决于固体的性质。例如，可以观察到许多水溶性物质在相对湿度明显低于该物质在水中的饱和溶液的相对湿度时发生的自发溶解过程^[5]。van Campen 等^[13~15]在所谓的“临界相对湿度”（ RH_c ）以上进行了固体潮解的吸湿动力学研究，而吸附水具有浓缩水的性质而且可以作为溶剂。一些不需要的过程也可能发生，例如，当 $RH_c < RH < RH_s$ 时，发生不需要的潮解，认识到这一点也很重要。

在前面所有的例子中，过程为吸收，水最终进入整个固体，粒径和表面积的变化不会影响整个行为。许多随后的例子中，表面积不仅是含水量的一个决定因素，而且在吸附时扰动固体，会产生明显的难以预料的结果。

Brunauer^[16]把蒸汽吸收的实验等温线分为经典的五种：I ~ V 型。Brunauer 等提出了多层物理吸附的统一理论^[17]，据说能够描述所有类型的等温线。本章提供了关于这个理论详细的讨论。在本章的讨论中，将不会考虑毛细

管的浓缩作用，而且主要讨论 I 型、II 型和 III 型。根据方程（3）~ 方程（5），可用图 2 表示这三种类型。

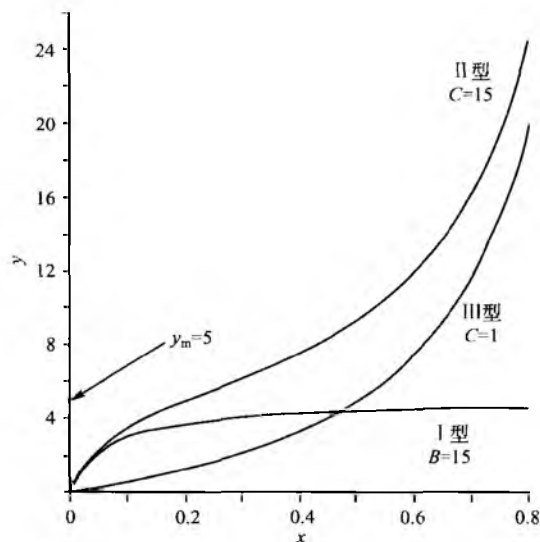


图 2 单层容量 $y_m=5$ 的假设的 I、II、III 型吸附等温线

I 型的等温线，吸附发生在强吸附部位，特点是吸附的蒸汽量单向增加，达到最大值后形成完整的单分子层。Langmuir 方程是适合 $n=f(x)$ 的函数关系式：

$$y = \frac{y_m Bx}{1 + Bx} \quad (3)$$

式中： y 为 $x = p/p_0$ 时吸附的水的量； y_m 为单分子层容量； B 为常数，通常称为吸附系数。一般假定 1250nm^2 为一个水分子在吸附面上所占有的面积，那么表面积可以根据 y_m 估算出。

II 型的特征是发生在多层吸附的开始阶段。Brunauer-Emmett-Teller (BET) 方程^[17]即方程（4），能够描述明显多层吸附的等温线：

$$y = \frac{y_m Cx}{(1-x)[1+(C-1)x]} \quad (4)$$

基于 BET 方程衍生的动力学假设，常数 C 与第一层的平均吸附热有关。III 型等温线发生在这个吸附热的值低的时候。

把 BET 方程应用到实验数据中，成为表面积测定的一个标准方法。常数 C 由一个低湿度（5%~30%）下的数据决定。基于这些参数，BET 方程几乎总是过多估计了固体在较高湿度下的含水量。

当湿度靠近 100% 时，根据 BET 理论来预测吸水量将是无限的。由于固体表面积的影响是一定的，那么吸附的分子层数目应该是有限的（假设固体是不溶的）。许多作者认为 BET 理论的“无限突变”是由于缺乏对侧面吸附的相互作用的考虑^[18~20]。

表面上，常数 C 与固体中水的状态有关，然而，在推导中过分简化的假设（第二层以及更高几层的所有分子有与水共同的特征，同时分子之间平行的相互作用在所有

的层中都忽略不计)导致了热力学上真正有用的信息的缺失。

BET 方程的改进式方程 (5), 假定吸附物有第三种热力学状态, 由 Guggenheim 等独立建立^[21]:

$$y = \frac{y_m CKx}{(1-Kx)[1+(C-1)Kx]} \quad (5)$$

式中: K 为与第一层的紧密结合水与水的中间态有关的常数。该模型也是简化的, 但在相对湿度高时比 BET 方程与数据更相符。方程 (5) 称为 GAB 方程^[22]。

这里所有的方程都是吸附量和空气中水蒸气压的单值关系。然而, 经常会观察到滞后现象。当一个样品达到特定的平衡含水量之后, 暴露在低的相对湿度下会发生解吸。许多情况下, 吸附和解吸等温线不是重合的。

图 3 是有滞后现象的 II 型的吸附图形。尽管滞后现象的原因有过很多讨论^[23~30], 这一现象通常归因于:

- 固体不可逆的干扰, 即吸附能够增加(溶胀)或减少(冷冻干燥的团块的坍塌)表面积;
- 动力学原因, 即事实上并没有达到新的平衡位置;
- 吸附物状态发生的一个实际变化。

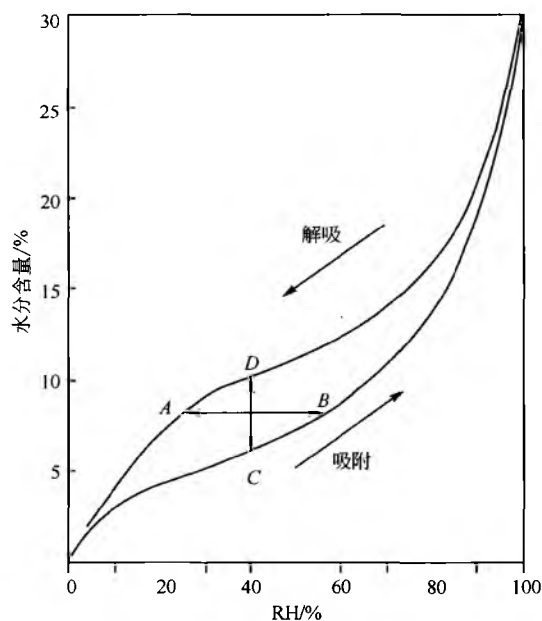


图 3 II 型滞后的等温线

许多人认为滞后现象是指一种物质在特定的相对湿度下(图 3 中的 CD)有不同的含水量。这种情况的含义是明显的: 物质的含水量取决于其以前暴露于不同相对湿度条件。控制相对湿度只能保证含水量在等温线指定的范围之内。滞后现象的另一层含义是指有相同的含水量的物质能够有不同化学活性的吸附水(图 3 中的 AB)。

尽管吸附等温线是湿度与水相互作用特性的基础, 一般还是不能仅根据等温线对水分与底物的作用做出任何评价。例如, 不能确定含水量的增加是多分子层吸附的结果, 或是底物的溶胀的结果, 或是两者结合作用的结果。

以下等温线分别是: 图 4 为乳糖, 图 5 为可压性糖^[31], 图 6 为微晶纤维素^[32], 图 7 为阿司匹林^[3]。乳糖的等温线数据与《药用辅料手册》^[10]中的数据相符, 而阶梯的等温线则不是很明显。图 4 的虚线是基于在 70% RH 下形成一水合物。

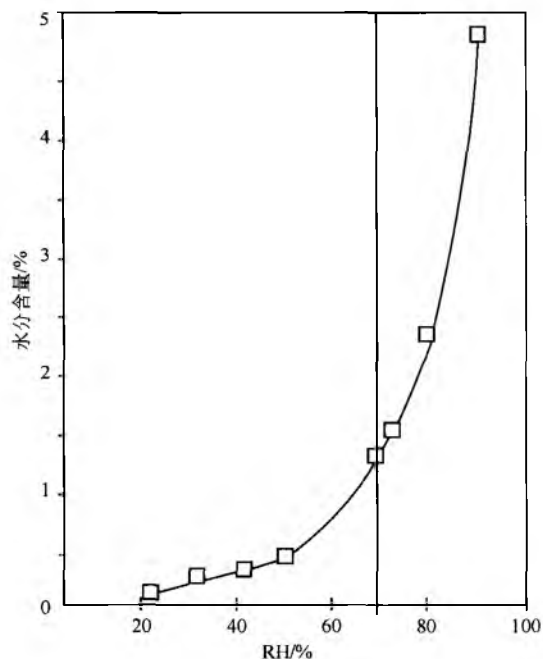


图 4 乳糖的吸湿等温线^[10]

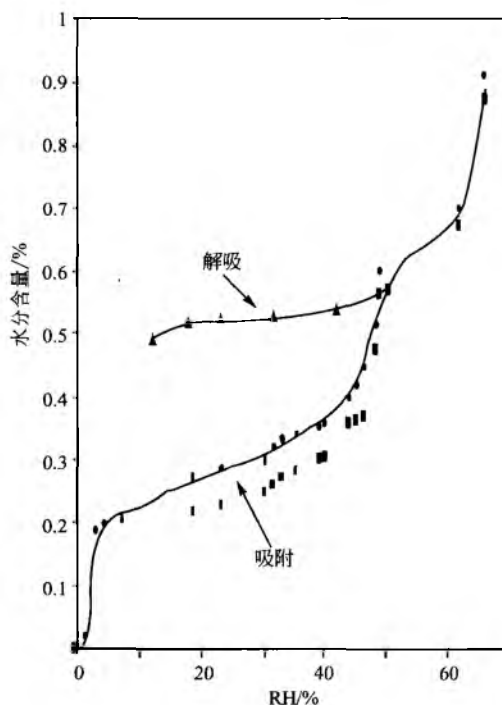


图 5 可压性糖的吸湿等温线^[31]

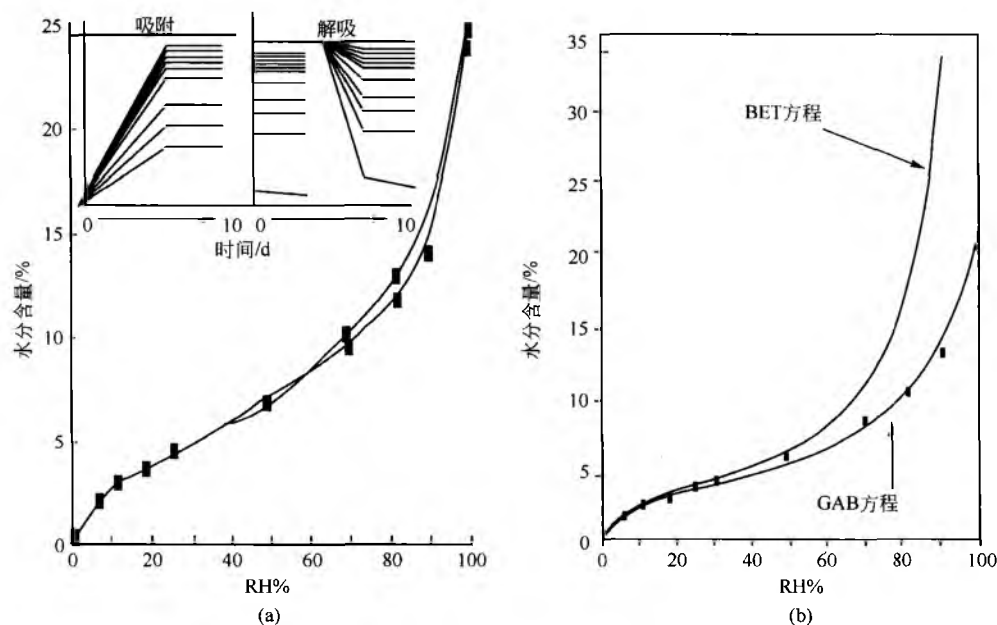


图6 (a) 微晶纤维素的吸湿等温线：吸附和解吸^[22]；(b) BET 和 GAB 方程对吸附的描述

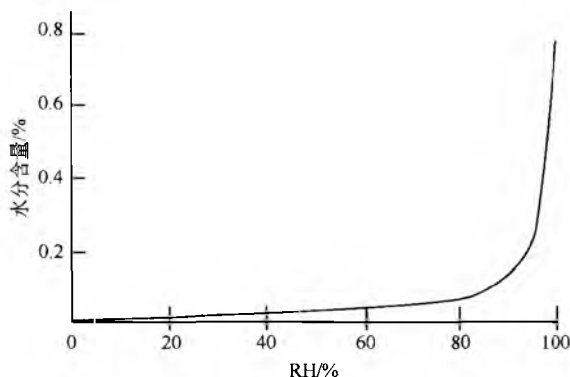


图7 阿司匹林的吸湿等温线^[3]

可压性糖 NF 是吸附水分非常少而且非常慢的一个例子，结果吸附等温线不光滑。在样品首先被很小心地除去所有水分的条件下，绘制吸附等温线。等温线的吸附和解吸分支明显不同，表明水形成了类似一水合物的相^[31]。Zografis 和 Kontny^[22]证明可压性糖吸收的几乎所有的水均与麦芽-糊精糖有关。

人们充分研究了微晶纤维素水分吸附的情况^[22,32,33]。图6(a)为微晶纤维素的吸附和解吸研究。插入的图表示含水量与时间的曲线，基本上可以代表在每一湿度下吸附和解吸的动力学。平衡吸附等温线(Ⅱ型)与 BET 方程相符合($C=16.48$, $y_m=0.033\text{g/g 固体}$)，见图6(b)，该图还显示了 GAB 方程用同样的单层容量描述的曲线。

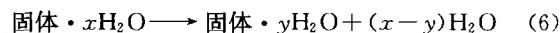
阿司匹林的等温线符合Ⅲ型，表明多分子层吸附对水的低亲和性。这四种类型等温线覆盖了药剂学中水分与固体相互作用的一个很宽的范围。

分析方法

单个分析方法不能定性水分与固体的相互作用。最好的方法就是综合使用下列方法。

在这个自动滴定、微处理器控制的热分析、可靠的光谱技术普遍应用的年代，一种最有力的技术即光学显微镜常被忽视。但在不同的相对湿度下直接观察样品也不能过分依赖该方法。在作者的实验室中，将有机玻璃室放在显微镜平台之上，已知湿度的空气能够通过其循环。这项简单的技术在进行崩解剂溶胀(或不溶胀)^[34]以及强亲水性辅料与湿度敏感性药物组合的影响^[3]的检查时非常有用。

在从固体中物理分离水分来进行水分测定时，必须认识到自由水和结合水必须要利用外力来分离：



式中： x 为最初与固体结合的水的摩尔数； y 为一直与固体结合的水的摩尔数； $x-y$ 为在外力作用下释放的水的量。所用的外力根据条件(如高温、低的蒸汽压、无水溶剂系统)的不同而不同。因此，不同方法测定的含水量可能完全不同。不能保证 $y=0$ ，没有理由期望不同方法得出的 y 是等值的。

值得注意的是，这些外力与引起制剂生产中或者生产后的产品中水分的释放的外力是不同的。在测定含水量时，应该注意认识到不同的方法可能产生不同的结果，而且这些结果之间没有相关性。

1. 热分析法

热重分析法(TGA)毫无疑问是用得最多的测定含水



量的分析方法。TGA 仪器的敏感性和复杂性从经典的水分天平 (LOD) 到专门设计的微量天平的真空密闭室不等。微处理器控制升温, 得到的数据重现性好、鉴别能力强。

图 8 为磷酸氢钙二水合物的 TGA 结果。曲线表示在干燥剂的作用下, 随温度的升高 (1.5°C/min), 样品质量减少。总质量减少是指在初始质量和最后干燥固体的恒量之间的差值。曲线有两个区域, 第一个开始于大约 90°C, 第二个大约在 170°C。假设水是仅有的挥发性成分, 计算表明 $W_D = 0.228$ (22.8% MC), W_D 值在区域 I、II 分别为 0.142 和 0.186。

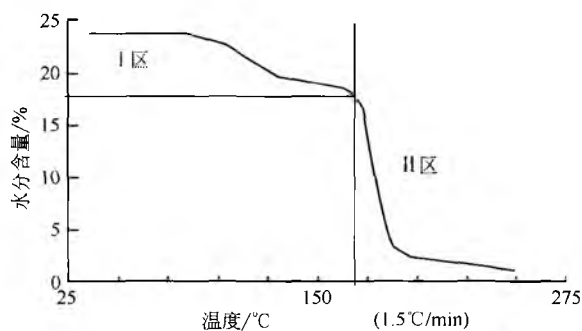
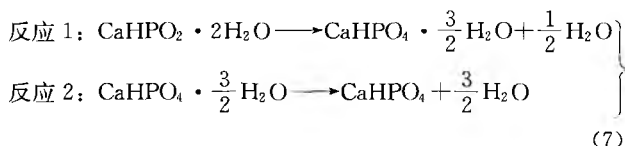


图 8 磷酸氢钙二水合物的热重分析

图 8 的曲线是晶体水合物的特征, 分隔的区域表示水分减少发生在相对较高的温度。这个特殊的曲线与方程 (7) 的脱水作用相符。



差示扫描量热法 (DSC) 是一种热分析法, 它可以测定非绝热过程的能量变化。将少量含湿固体放在金属容器中, 并且暴露在温度受控的升温环境中。从样品中离解出来的水, 通过氮气流从加热室吹出来, 记录将样品保持在与空白样品容器相同温度的动态能量消耗 (mcal/s)。当温度以恒定速率持续升高时, DSC 曲线下面积反映能量, 这个能量是与发生相变化有关的热量。

磷酸氢钙二水合物的 DSC 图 (图 9 的 A 曲线) 包括两个恒温过程, 与方程 (7) 中的脱水作用相符 (这里所有的 DSC 曲线中, 恒温是正相偏离基线)。应该注意到能量变化的测定并不仅仅与水相关的, 它还包括晶体结构变化时能量的消耗或者释放。因此, 从脱水作用的焓变来估计含水量, 以及水蒸发的比热容是不恰当的。

一个经常犯的错误是, 看到温度曲线 (TGA 或 DSC) 就得出结论, 例如, 50°C 时磷酸二氢钙是不释放水的。认识到这是一个动力学实验很重要, 这个实验在相对较短的时间内, 温度在一个大的范围内升高。磷酸二氢钙暴露于 50°C 时会失去水合水, 系统没有处在特定温度下, 失水的相对速率较低。

图 9 的曲线 B 是无水磷酸二钙的一个有趣的实验结果,

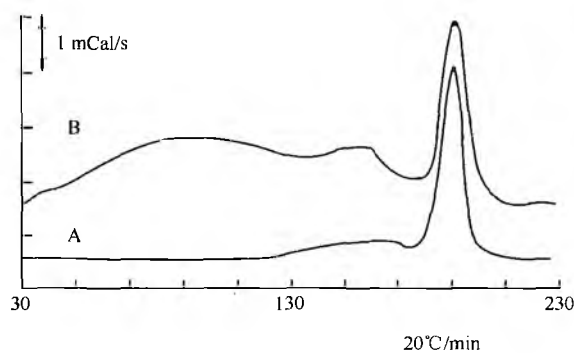


图 9 磷酸氢钙的差示扫描量热图。A. 磷酸氢钙二水合物; B. 吸湿的无水磷酸氢钙

无水磷酸二钙暴露在 100%RH 中三个月。很明显, 固体得到的一些水分转化为结晶水。然而, 在 50~130°C 的宽的吸热峰表示水离解的能量消耗不是晶体结构的一部分。同一固体中存在两态的水会引起一连串 (关于将无水磷酸氢钙用作温度敏感性辅料是否明智) 的问题。

图 10 为乳糖的 TGA 曲线。这个曲线与一水合物一步失去结合水相符。图 11 为乳糖的 DSC 数据。无水乳糖的扫描曲线 A 很不平坦, 尽管与其他扫描曲线相比, 似乎这是

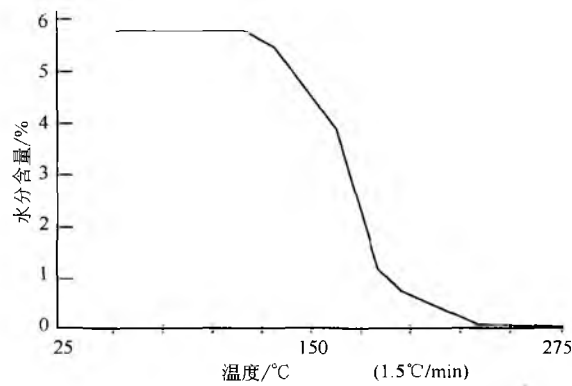


图 10 乳糖一水合物的热重分析

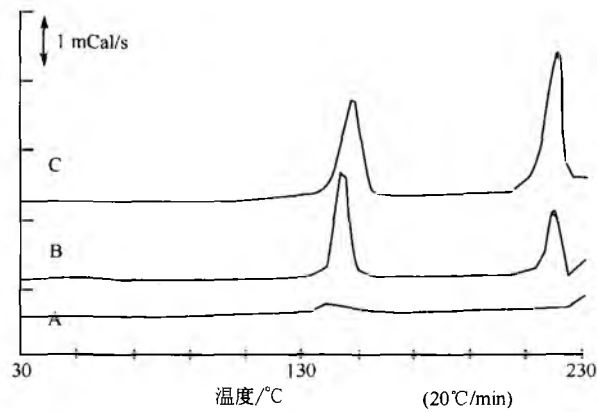


图 11 乳糖样品的差示扫描量热图。A. 无水乳糖; B. 乳糖一水合物; C. 带吸附水的无水乳糖

因为存在少量水。扫描曲线 B 是乳糖—水合物的曲线，唯一的结晶水在大约 135℃ 时失去，分解大约发生在 200℃。扫描曲线 C 是无水乳糖样品在 100% RH 中放置三天的曲线。很明显，无水乳糖的吸附水很快并且完全转化为结晶水。

微晶纤维素的热分析显示了完全不同的结果。TGA 曲线（图 12）显示在低温下失水，以及合理的单向递减并不会使结合水失去。DSC（图 13）表示在低于水的沸点的一个很宽的范围内水分的减少。

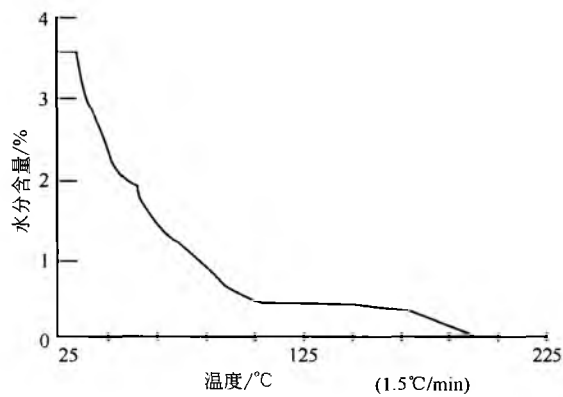


图 12 微晶纤维素的热重分析图

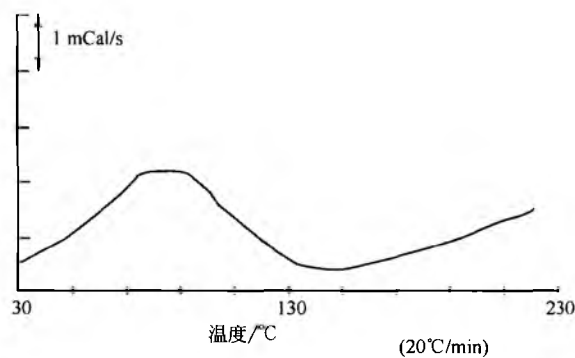


图 13 微晶纤维素的差示扫描量热图

热分析方法的主要优势在于方便。然而这些分析并不是专门测定水分的。同时暴露于高温可能成为非实在的作用力或者可能改变样品。一种可以接受的含水量测定的方法是用热分析方法提供在最少残留水分和固体改变最小条件下的结果。热分析方法能够与专门的水分滴定相结合，将 TGA 或 DSC 中出来的气体通入滴定介质中。

2. Karl Fisher 滴定

60 多年前，Karl Fisher 发明了用一种试剂进行专门的水分滴定，这种试剂为甲醇中溶有碘、二氧化硫和吡啶。Karl Fisher 的水分滴定在多数的分析化学课本中提到，这里就不再具体讲了。最近发表了一个药剂学的简单综述^[35]。然而，这种方法在固体水分测定中的优缺点将在下文讲到。

以最简单的方式说，Karl Fisher（简称为 KF）滴定是

含水量的一个单点测定。这种方法的主要优点是专门用于水分滴定，同时也是一种非热力学方法，这种方法非常敏感，而且容易实现自动化。这种方法的主要缺点在于，固体必须溶于滴定介质，以保证所有的水都已经释放出来。对于不溶性固体，如果能够很仔细地设计，使每次都能从固体中“提取”出相同的程度的水分，那么就能够得到精确、重现性好的结果。

由于自动化的实现，Karl Fisher 滴定可以提供滴定动力学曲线（例如，毫升滴定液与时间的关系）。如果水从固体中的释放速率是限速步骤，Karl Fisher 滴定动力学曲线能够提供关于固体中水的状态的间接信息。图 14 是磷酸氢钙二水合物的两种不同样品的滴定曲线。在图 15 的滴定曲线中，数据已经得到了校正，这样每次滴定最终都消耗 25mL 的试剂。这种校正方法与以某种方式增加样品量相似，这种方式是指样品中所含的有效水的量需要用 25mL 试剂来中和。直接滴定将在 90s 内完成。

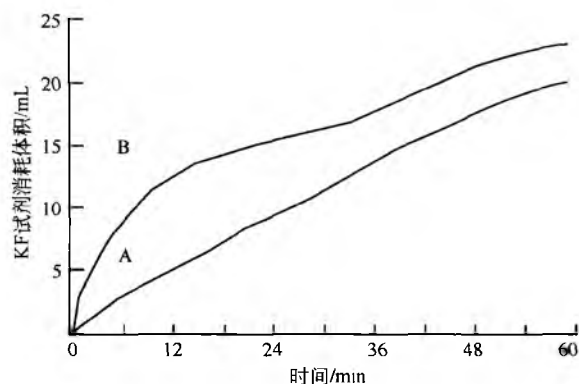


图 14 磷酸氢钙二水合物的校正滴定曲线。A. 未研磨样品；B. 研磨样品

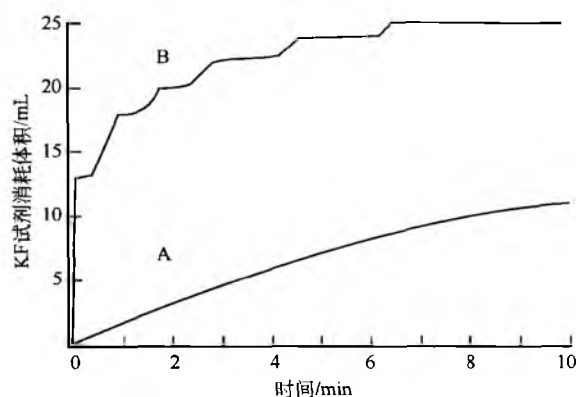


图 15 磷酸氢钙的 Karl Fisher 校正滴定曲线。A. 研磨样品；B. 吸湿的无水样品

磷酸氢钙二水合物的滴定曲线并不是无变化的，图中的几个脱水阶梯与方程（7）一致。同样明显的是，研磨过的辅料样品水分释放要快一些（图 14 中 B 曲线）。这与小粒径能够增加总表面积、缩短扩散距离相符。

在图 15 中, Karl Fisher 滴定无水的在 100%RH 下放了三个月的磷酸氢钙(曲线 B), 并与研磨的磷酸氢钙二水合物比较(曲线 A)。由于吸附水并没有进入晶格结构, 所以能够很快从固体中释放出来。

乳糖一水合物和微晶纤维素的校正 Karl Fisher 滴定曲线结果都表明与水没有明显变化, 表明水分释放很快。

3. 光谱法

定性固体中水分最有用的光谱方法是傅里叶转换红外光谱(FTIR)、核磁共振(NMR)以及 X 射线粉末衍射(XRD)。本章并没有给出有关这些方法完整的介绍, 而总结了 Brittan 等^[36]的氨苄西林例子。

正常情况下, 水合物形成了晶体结构(伪多晶型物), 与无定形不同。图 16 为氨苄西林无定形物和三水合物的粉末 XRD 图谱。尽管含水量提供的值接近化学计量值, 区分晶体结构的 X 射线验证是确定水合物所必需的。

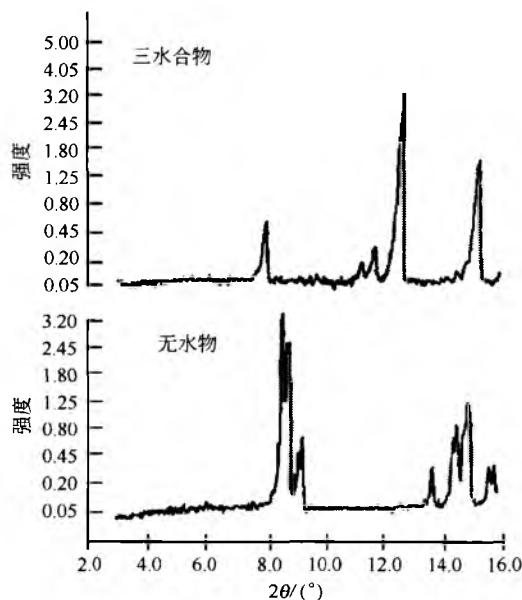


图 16 氨苄西林样品的部分 X 射线衍射图谱^[36]

X 射线方法不仅仅在定性方面很有用。当样品中同时包含无水物和水合物时, 还可以确定图形的特征区域, 这

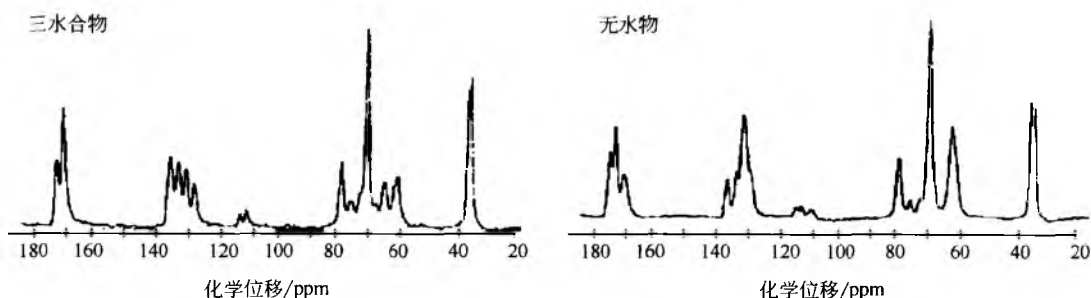


图 18 氨苄西林样品的固态¹³C NMR 光谱

些区域的相对峰面积可以用来确定每一相的相对量^[36]。

固体中水的红外分析集中于评价环境对—OH 基团伸缩振动频率的影响。自由水在气态时的—OH 伸缩振动的特征吸收峰在 3655cm⁻¹处。当水浓缩和(或)结合时伸缩振动频率降低。冰中—OH 的特征伸缩频率为 3400cm⁻¹。对比无定形物与水合物的 FTIR 光谱, 可以确定水的—OH 键。图 17 中特征的尖峰是结晶水的峰, 当水以几种形态存在时, 光谱中可以看到多条谱带。

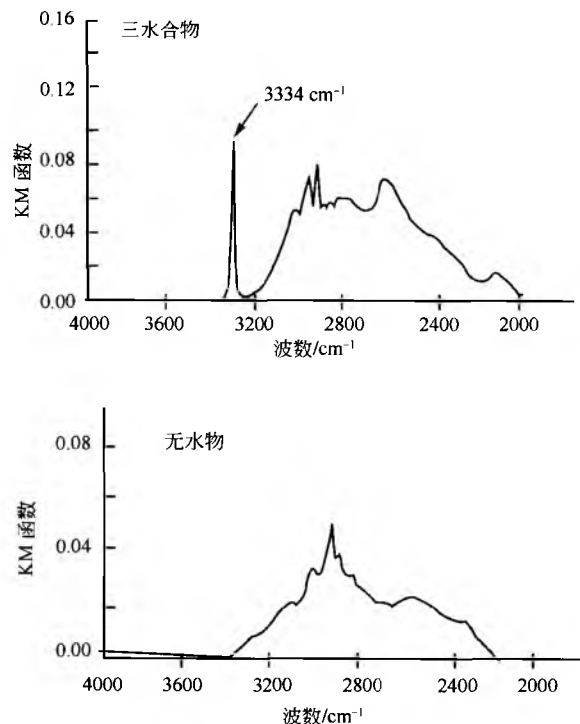


图 17 氨苄西林样品的部分 FTIR 图谱^[36]

固态 NMR 法能够增加对固体中水的状态的了解, 以及理解它对目标化学品的特定影响。在图 18 中, 很明显三水合氨苄西林与其无水物的固态¹³C NMR 光谱完全不同。尽管无水物中有三个羰基的共振(169.7ppm、172.7ppm 和 174.6ppm), 有趣的是水合物只有两个共振(170.4ppm 和 172.6ppm)完全分开^[33]。因此, 后者三个羰基中的两种是相等的。也有证据表明水合物中芳环碳的振动也不同。

水分对产品和(或)工艺的影响

对已经完成的大量的研究并没有试图给出这样一个综合性的总结,即水分到底是怎样影响工艺以及药物固体和剂型的稳定性的。更多的信息,读者可参阅一些经典教材^[10,27,37,40,41]、最近关于该主题的文献^[5,11,42,43]、有关专门强调水分在稳定性中作用的文献^[44~47],以及有关可压性的文献^[48~52]等。

前文讨论了水溶性物质的潮解,现在的重点是水分对固体剂型次要的影响,涉及三个与本章前面提到的信息有关的领域:①水分引起的固体状态的改变;②水分对生产压制片时辅料性能的影响;③生物活性剂及其与辅料组合的化学稳定性。

1. 湿度引起的变化

Carstensen 和 Van Scoik^[51]最近证明水分可能在很大程度上影响物质的物理性质。通过冻干法制得的无定形蔗糖球体,放在 33%RH 环境中。冻干法能够特征性产生多孔的无定形团块。如图 19 所示,研究的开始几天,含水量增加很快。然而,多孔的无定形蔗糖吸收的水分将最终导致结构的坍塌,同时由于有效表面积急剧减少,而使得水分含量相应地减少。不仅是无定形物的物理结构从松到更密的变化,而且蔗糖由无定形物向晶体转变,其速率取决于相对湿度。这个例子与研究重点逐渐放在固体由于吸附水而产生状态的变化的趋势相符。用热力学方法评价固体的一个困难是,表面积会持续变化。Copeland 和 Young^[53]在 1961 年提出了一个早期的热力学方法,来解决这个问题。他们认为吸附剂的摩尔数的变化是因为在相同的比表面积下增加或减少一些粒子,这是将粉末系统作为连续函数进行热力学处理的基础。Wu 和 Copeland^[54]用这种方法研究了硫酸钡。他们发现了反驳惰性吸附理论的明显证据,而且证明了尽管吸附物的热力学值一般小于被吸附物,这可能是一个误导。吸附物性质是各个组分的平均性质。当吸附的水分在固体中均匀分布时,这种估计是合理的。然而,如果这个过程是吸附,而且吸附剂仅有开始少数几层受影响,那么热力学变化将会很大。很少有药剂学研究涉及吸附剂热力学性质的测定,而这一领域将成为以后研究的一个很有希望的领域。

Zografi^[5]讨论了吸附剂变化的必要性。他观察了水吸收进入固体结构中,可以作为增塑剂,降低玻璃转化温度。当温度高于玻璃转化温度时,系统中分子或片段中分子的流动性增强^[5]。从“玻璃态”到“橡胶态”的变化能说明药剂学上一系列的物理化学过程,包括冻干的团块的坍塌和随后的晶体化(见之前的例子)、直接可压缩性、粉末结块性、包衣和包装材料的穿透性,以及固态的化学稳定性^[5]。认识到这一事实,成为最近为理解和预测水分的影响建立框架的最重要的一个进步。

Zografi 和 Kontny^[22]校正了实验测定微晶纤维素结晶

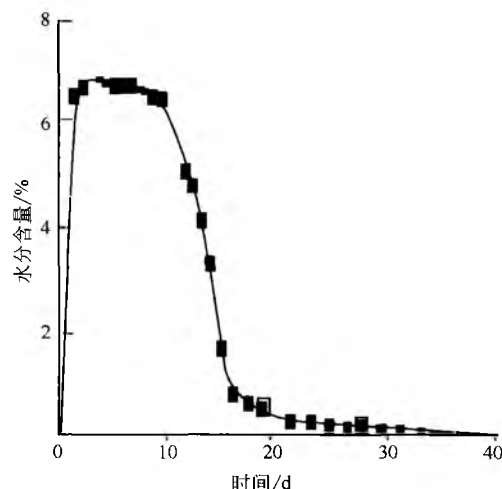


图 19 无定形蔗糖于 23℃ 33%RH 的吸湿^[51]

的单分子层容量以测定结晶度,发现这些值都相互符合,比较合理。这个结果支持了这样的结论,即微晶纤维素中的水局限在非晶体区域^[22,56]。

2. 水分对辅料和片剂生产的影响

吸附水一般会影响纤维素的整体性质^[58,59]。微晶纤维素的固体性质变化的影响,可以在压片操作中很简单地表现出来。干的微晶纤维素(%MC=0.07)与含水量高于单分子层(%MC=5.1)的材料进行了比较。水在这些样品中的热力学图是以被吸附物的热力学性质为基础的:对于干固体, $\Delta H > 3.5 \text{ kcal/mol}$ (14.65 kJ/mol), $\Delta G > 2.3 \text{ kcal/mol}$ (9.6 kJ/mol), $\Delta S < 4.12$ 个熵单位 (e. u.)/mol, 而当水分在 5.1% 或者 1.5 倍单分子层容量时, $\Delta H = 1.5 \text{ kcal/mol}$ (6.27 kJ/mol), $\Delta G = 0.53 \text{ kcal/mol}$ (2.21 kJ/mol), $\Delta S = 3.35 \text{ e. u.}/\text{mol}$ 。(熵的差值在单分子层完成时达到最高水平,自由能在两个状态的不同可以认为主要是由于水与固体的结合)。

每次将预先处理好的材料放置在压片机的料斗中,这两种材料的性能在相同的机器设置下进行比较。5.1% MC 的样品生产的片剂质量稍微轻些(对流动性和松密度的影响),这是在低压力下的结果。然而,含水的微晶纤维素的片剂硬度较大,尽管压力比较低。片剂压力与硬度的轨迹曲线(图 20)表明了两种材料的不同基本行为。

在一个相似的更广范围的研究中,可压性糖的可压性可以由预先在不同的湿度下处理的材料测得。这些样品的硬度与可压性曲线(图 21)为一组直线,其斜率是含水量的函数。这种关系在图 22 中也同样可以看到,这里的直线的斜率也可以作可压性指数。该指数是含水量的线性函数,含可解吸水分的样品与含吸附水分的没有什么不同。

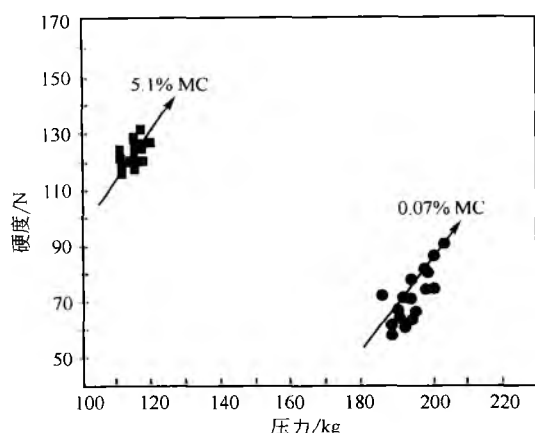


图 20 0.07%MC 和 5.1%MC 的微晶纤维素片剂压力与硬度的关系

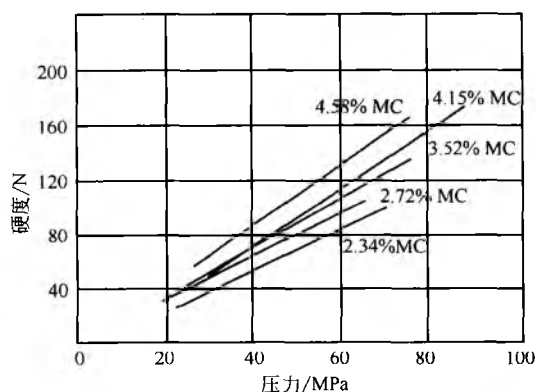


图 21 不同含水量的可压性糖的硬度与压力的关系^[31]

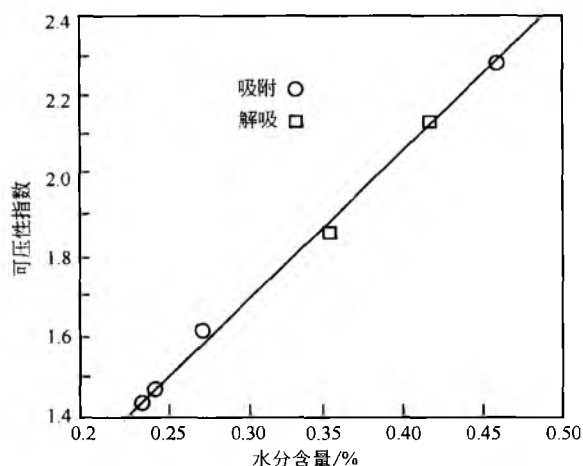


图 22 可压性糖的可压性指数为水分含量的函数^[31]

3. 生物活性物质的化学稳定性

尽管在理解水分对固体的物理状态的影响上最近有一些进步, 吸附水对化学敏感性药物的化学性质作用可能是最重要的, 特别是因为许多新的生物活性物质都是很昂贵

的水分敏感的蛋白质。

关于水分对蛋白质的性质和稳定性的影响的研究文献很多, 而且增加也很快。蛋白质和聚合物中的水分的检查也与药剂科学家研究处方及加工小分子药物有关。因为使用的许多辅料都属于大分子。Hageman^[44]发表了一篇从药剂学角度写的关于蛋白质的稳定性的综述。他描述了含水量和活性对蛋白质的固态稳定性的影响:

- 动力学活性的变化;
- 构象稳定性的变化;
- 水作为反应试剂或抑制剂参与;
- 水分作为反应试剂移动的介质。

利用溶菌酶和其他蛋白质的水合作用数据进行分析, Hageman^[44]描述了基于结合水的某些性质的水合关键范围(羧酸根的吸收峰在 1580cm^{-1} , 酰胺-1 转移的化学位移在 1660cm^{-1} , OD 伸缩振动频率在 2570cm^{-1} , 比热容, 抗磁性)。但在单分子层容量以下时, 这些水的物理性质变化不大, 而且这时水的移动性很小。水分在 6%~25% 时, 结合水的性质变化很大, 高于 25% 时, 结合水的性质与大量的水的性质相似。

在图 23 中, Hageman 把水分在生物分子反应中的作用分为三种情况。反应速率的增大是由于固体中水的状态的变化, 反映了低的有效黏度。第一种情况, 在单分子层以上时, 随含水量的增大反应速率也在增大。当所有的反应试剂都溶解后, 更多的水稀释介质, 形成第二种情况。如果稀释过多, 或者水是分解作用的产物抑制剂, 这时可以观察到速率的降低(第三种情况)。第三种情况的行为是水分在 Maillard 反应进程作用的一个例子, 该反应涉及含葡萄糖处方: α -N-乙酰基-L-赖氨酸、聚-L-赖氨酸、胰岛素、酪蛋白以及血浆蛋白^[43]。其中在一定湿度下(除了 100% RH)存在一个最大降解速率, 在其他情况下也可以观察到这一点。

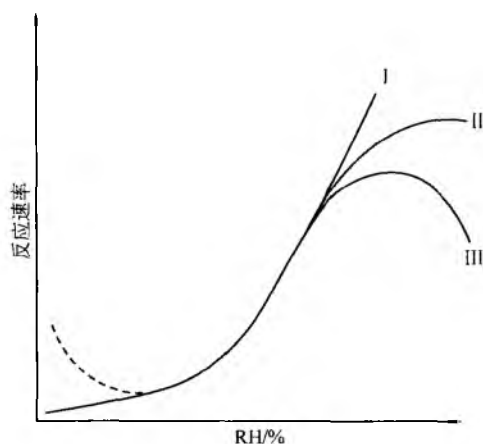


图 23 吸附水对固态生物分子反应速率的影响^[43]

处方中的辅料能够影响产品的稳定性。一个诱人的概念性策略是在处方中加入“水分清除剂”。在含有葡萄糖的系统中, 发现固体和液体的致湿剂能够影响系统中水分的

流动性。最大反应速率在湿度从 40% 到 80% RH 时变化, 这取决于添加剂^[43]。液体(如甘油或者丙二醇)的添加可以降低活动点, 促使反应在相对低的湿度下进行。固体致湿剂山梨醇的添加可以明显降低反应速率, 通过减少反应试剂移动的自由水实现。

Carstensen^[11]发表了一篇水分对小分子药物稳定性的作用的总结, 说明有三种情况: 难以除去的水分的分解作用、固体和溶解状态的同时分解、有限量水的分解作用。在本章的讨论中, 强调了水解降解过程。

第一种情况, Leeson 和 Mattocks^[65]最初提出的模型中有大量的水, 假设固体颗粒被水分子层包围, 这个水分子层具有足够的流动性, 可以溶解药物。如果水分子层一直有药物饱和, 那么得到一个表观零级的降解过程:

$$-\frac{dM}{dt} = kS[H_2O] \quad (8)$$

式中: $-dM/dt$ 为药物减少速率; k 为反应速率常数; S 为水层中药物的饱和浓度; $[H_2O]$ 为水的浓度。尽管这种简单的方法在稳定性研究中足够描述数据了, 但并不能解释前文介绍的以不同状态存在的水的作用。

如阿司匹林粉末的降解, 在 100% RH、25℃ 放置 120 天后, 比混悬液降解的速率快 10 倍还多^[48]。除此之外, 阿司匹林降解的实际速率随着时间的增加而增大^[60,61]。Carstensen 提出一个理论来描述这种非线性关系, 这种关系是以水杨酸的形成实际上是阿司匹林的高能水分吸附部位的暴露为基础的^[61], 因此, 可以获得更多的水。这种解释能说明速率随时间增加, 但并不能解释为什么粉末的降解速率比混悬液的高, 且混悬液中水分是大大过量的。这种速率的增加可以归因于特殊的酸催化剂, 这种催化剂在一个相对体积很小的膜里, 而且水解作用可以强烈地影响 pH^[61]。

最后, 当水分敏感性药物与亲水性辅料结合时, 情况就变得复杂了, 见图 24。在这项研究中, 阿司匹林与 4% 的崩解剂结合, 在 25℃、不同相对湿度下放置 120 天。含水量在最初的几天里达到稳定, 降解结果以每摩尔水降解的水杨酸的摩尔数表示。A 点仅是阿司匹林在 100% RH 下的结果。

这些结果证明了这里介绍的许多观点。在 100% RH 下, 交联纤维素与羧甲基淀粉钠的反应速率比预期的低, 因为崩解剂溶胀, 这样有效的水分减少(交联聚维酮并不溶胀)。校正是以总水量为基础的, 这样可能高估了有效的反应水量和低估了实际反应速率。另一个极端(20% RH), 分析偏差仍然是高估了有效水量, 但理由不同的。此时系统中的水与崩解剂紧密结合无法使用。在中间湿度时, 取决于辅料, 观察到的降解速率比预期值要高。这种行为可能是活化吸附过程以及 Carstensen^[61]提出的特殊的酸催化的结果。然而, 这种结果使得想要开发一种稳定的且崩解很快的片剂的药剂开发人员感到不安。

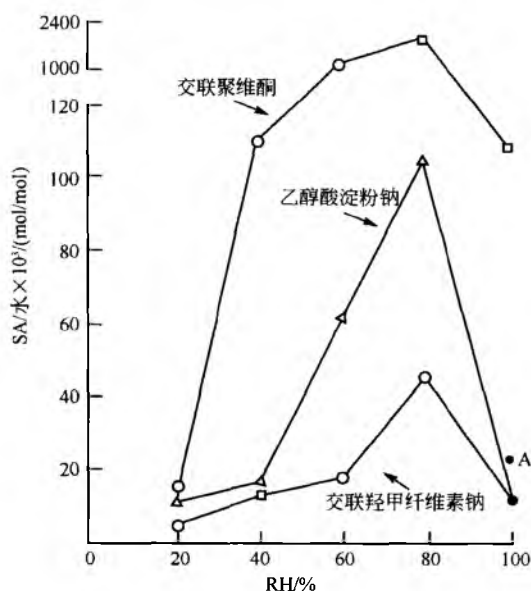


图 24 湿度对 25℃ 放置 120 天的阿司匹林-崩解剂混合物中水杨酸含量的影响^[60]

小结

在过去的 10 年中已经取得了实际的进步, 给药剂科学家提供了坚实的基础来理解水与药物固体的相互作用。多数这样的进步是一个范式转换的结果: 固体作为惰性底物的模型几乎是无效的。固体-水系统中水的状态的进一步定性为设计一种稳定的剂型提供了基础, 并可能建立一种基于性能的药用辅料标准。

参考文献

1. Encyclopedia Americana; Grolier; Danbury, CT, 1991; 28, 432.
2. Webster's Ninth New Collegiate Dictionary; Merriam-Webster Inc.; Springfield, MA, 1990; 763.
3. Mitrejev, A.; Hollenbeck, R. G. Int. J. Pharm. 1983, 14, 243.
4. Kontny, M. J. Drug Dev. Ind. Pharm. 1988, 14, 1991.
5. Zografi, G. Drug Dev. Ind. Pharm. 1988, 14, 1905.
6. Gibbs, J. W. The Collected Works of J. Willard Gibbs; Yale University Press; New Haven, 1948; 1.
7. The United States Pharmacopeia 24th Rev., The National Formulary, 19th Ed. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville MD, 2000.
8. Hollenbeck, R. G. Determination of Water; Compendial Viewpoint Proceedings of the Seventh Wisconsin Update Conference, Carstensen, J. T. Ed.; Extension Services in Pharmacy, University of Wisconsin, Madison, 1988; 77, 91.

9. Zografi, G. *Pharmaceutical Forum*, Nov-Dec: 3240 (1987) .
10. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*; American Pharmaceutical Association; Washington, DC, 1986.
11. Carstensen, J. T. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1988, 14, 1927.
12. Hammond, W. A. *Drierite and its Applications*; The Stoneman Press; Columbus, OH, 1958.
13. Van Campen, L.; Amidon, G. L.; Zografi, G. J. *Pharm. Sci.* 1983, 72 (12), 1381.
14. Van Campen, L.; Amidon, G. L.; Zografi, G. J. *Pharm. Sci.* 1983, 72 (12), 1388.
15. Van Campen, L.; Amidon, G. L.; Zografi, G. J. *Pharm. Sci.* 1983, 72 (12), 1394.
16. Brunauer, S. *The Adsorption of Gases and Vapors*; Princeton University Press; Princeton NJ, 1943; 1.
17. Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E. J. *Am. Chem. Soc.* 1938, 60, 309.
18. Hill, T. L. *Adv. Catal.* 1952, 4, 211.
19. Cassel, H. M. J. *Chem. Phys.* 1944, 12, 115.
20. Cassel, H. M. J. *Phys. Chem.* 1944, 48, 195.
21. Guggenheim, E. A. *Applications of Statistical Mechanics*; Clarendon Press; Oxford, 1986.
22. Zografi, G.; Kontny, M. J. *Pharm. Res.* 1986, 3, 187.
23. Dunford, H. B.; Morrison, J. L. *Can. J. Chem.* 1955, 33, 904.
24. Argue, G. H.; Maass, O. *Can. J. Res.* 1935, 12, 564.
25. Babbitt, J. D. *Can. J. Res.* 1942, 20, 143.
26. Morrison, J. L.; Dzieciuch, M. A. *Can. J. Chem.* 1959, 37, 1379.
27. Gregg, S. J. *The Surface Chemistry of Solids*; Reinhold Publishing Co.; New York, 1951.
28. Young, J. H.; Nelson, G. L. *Trans. Am. Agric. Eng.* 1967, 10, 260.
29. Young, J. H.; Nelson, G. L. *Trans. Am. Agric. Eng.* 1967, 10, 756.
30. York, P. J. *Pharm. Pharmacol.* 1981, 33, 269.
31. Tabibi, S. E.; Hollenbeck, R. G. *Int. J. Pharm.* 1984, 18, 169.
32. Hollenbeck, R. G.; Peck, G. E.; Kildsig, D. O. J. *Pharm. Sci.* 1978, 67, 1599.
33. Marshall, K.; Sixsmith, D. *Drug Dev. Commun.* 1974-75, 1, 51.
34. Mitrejev, A.; Hollenbeck, R. G. *Pharmaceut. Technol.* 1982, 6 (10), 48.
35. Connors, K. A. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1988, 14, 1891.
36. Brittan, H. G.; Bugay, D. E.; Bogdanowich, S. J.; DeVincentis, J. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1988, 14, 2029.
37. Adamson, A. A. *Physical Chemistry of Surfaces*, 4th Ed.; John Wiley & Sons; NY, 1982.
38. Harkins, W. D.; Jura, G. J. *Am. Chem. Soc.* 1944, 66, 919.
39. Franks, F. *Water: A Comprehensive Treatment*; Plenum Press; New York, 1972; 1 and 5, 1975.
40. Carstensen, J. T. *Pharmaceutics of Solids and Solid Dosage Forms*; Wiley; New York NY, 1977.
41. Connors, K. A.; Amidon, G. L.; Stella, V. J. *Chemical Stability of Pharmaceuticals*; Wiley-Interscience; New York, 1986.
42. York, P. *Int. J. Pharm.* 1983, 14, 1.
43. Umprayn, K.; Mendes, R. W. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1989, 13 (4-5), 653.
44. Hageman, M. J. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1988, 14, 2047.
45. Plotkowiak, Z. *Pharmazie* 1989, 44 (2), 837.
46. Fassihi, A. R.; Persicaner, P. H. R. *Int. J. Pharm.* 1987, 37 (1-2), 167.
47. Hageman, M. J.; *Water Sorption and Solid-State Stability of Proteins. Stability of Protein Pharmaceuticals*; Ahern, T. J., Manning, M. C., Eds.; Plenum Press; New York, 1992.
48. Shukla, J.; Price, J. C. *Pharm. Res.* 1991, 8 (3), 336.
49. Ahlneck, C.; Alderborn, G. *Int. J. Pharm.* 1989, 56 (2), 143.
50. Teng, C. D.; Alkan, M. H.; Groves, M. J. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1986, 12 (11-13), 2325.
51. Carstensen, J. T.; Van Scoik, K. *Pharm. Res.* 1990, 7, 1278.
52. Groves, M. J.; Teng, C. D.; *The Effect of Compaction and Moisture on Some Physical and Biological Properties of Proteins. Stability of Protein Pharmaceuticals*; Ahern, T. J., Manning, M. C., Eds.; Plenum Press; New York, 1992.
53. Copeland, L. E.; Young, T. F. *Adv. Chem. Ser.* 1961, 33, 348.
54. Wu, Y. C.; Copeland, L. E. *Adv. Chem. Ser.* 1961, 33, 357.
55. Leeson, L. J.; Mattocks, A. M. J. *Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 1958, 47 (5), 329.
56. Zografi, G.; Kontny, M. J.; Yang, A. Y. S.; Brenner, G. S. *Int. J. Pharm.* 1984, 18 (1-2), 99.
57. Ben-Rayana, E.; Seddas, A.; Ruelle, P.; Ho, N. T.; Kesselring, U. W. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 1990, 187, 617.
58. Blair, T. C.; Buchton, G.; Breezer, A. E.; Bloomfield, S. K. *Int. J. Pharm.* 1990, 63 (3), 257.

59. Sadeghnejad, G. R.; York, P.; Stanley-Wood, N. G.; Water Vapour Interaction with Pharmaceutical Cellulose Powders. *Pharmaceutical Technology; Drug Stability*; Rubenstein, M. H., Ed.; Ellis Horwood Limited; West Sussex, UK, 1989.
60. Mitrevej, A. A Comprehensive Study of Water Vapor Sorption by Aspirin-Disintegrant Blends and its Relationship to Aspirin Stability; Ph. D. Thesis, 1982.
61. Carstensen, J. T.; Attarchi, F. J. *Pharm. Sci.* 1988, 74 (4), 314.

(刘笑芬 译)

Y



药品主文件

C. Jeanne Taborsky

Brian James Reamer

SciRegs Consulting, Columbia, Maryland, U. S. A.

引言

在美国,为了让一种新药或通用名药上市,在大多数情况下,厂商必须向美国食品与药品管理局(FDA)提交药品的申请文件,FDA必须审阅和批准药品的申请。为帮助该药品的申请,厂商可参考提交给FDA的药品主文件(DMF)中的信息。这些信息是保密的,DMF中技术部分的内容通常只有在被DMF持有者授权后,或者在新药研究(IND)、新药申请(NDA)、简化新药申请(ANDA)或出口申请有关的审阅时方可参阅。一家公司如果想对一个已批准的药品进行临床研究,必须提交IND文件;制药企业若想上市一种新药或对已批准的药品用新的容器或处方应提交NDA;一家公司若想上市一种通用名药应提交ANDA;某家公司想出口在美国市场未被批准的药品,应依据食品、药品及化妆品的联邦法典第802部分进行出口申请。在审阅过程中,DMF是关键的一部分,它的用途也日益广泛,也正是由于这个原因,许多药品的申请者不再选择没有DMF的供应商。药品主文件不是被接受或是被拒绝,而是要发现所提交的药品主文件中符合要求的和不足之处以帮助顺利完成药品申请。1938年以前上市的药品或列入非处方药目录的药品被允许无须向FDA提交申请文件。

FDA的组织机构

FDA下设几个中心,具有各自的法规和职责^[1],这些中心以及各自的职责如下:

- CSFAN——食品安全和营养中心,负责管理食品、食品补充剂和化妆品;
- CBER——生物评价和研究中心,负责管理生物制品及血制品;
- CDRH——器械及放射健康中心,负责管理医疗器械、药盒和诊断试剂;
- CVM——兽用药中心,负责动物用药的管理;
- CDER——药物评价及研究中心,负责药品的管理。

提交给CDER的药品申请文件包括了IND、NDA以及适用于通用名药的ANDA^[2],CDER、CBER和CVM有权享有同一份药品主文件。

CDRH并不使用提交给CDER的DMF文件,向CDRH提交的文件不会用来支持提交给CDER的药品申请

或被审阅。这样,药品评审和批准的过程很重要,因为会存在由多个中心管理的某些材料如成分在使用中的重叠。若销售的仅是注射器,不含药物,则由CDRH部门管制,含有药物的注射器由CDER部门审查,在FDA内部各中心协定来分配权利。若CDER的评审者提出疑问,CDRH仅能在成分上进行解释,因此提供给CDRH的有关注射器的文件信息并不能免除向CDER提交DMF文件的要求。CDER详尽规定的这些FDA期望审查的信息能有助于药品申请,这些信息资料应列入药品申请提交文件或相关DMF文件中。

药品主文件

DMF文件是由个人或公司提交给FDA的资料^[3]。DMF文件的目的是允许药品申请者使用包含在DMF中的信息,以支持药品的申请或对已批准的申请补充变更,而不必将信息内容披露给药品申请者。DMF原先是DMF提供方所使用的一种方式,将有限的机密性或有关知识产权的信息内容提交给FDA以支持申请。这些信息对于最终使用者和竞争对手而言都是保密的。在美国,保密是整个过程中重要的一方面;在欧洲,DMF持有者与申请者之间的关系与美国有所不同:DMF持有者将DMF的复印件提供给药品申请者或用户,这种现象是常有的。

尽管公司对提交自己的DMF文件,或提供信息给药品申请者有选择权,但是对于药品申请者提交信息有许多不利之处,知识产权的持有者不得不将信息委托给申请者,因此失去了对它的控制权。“控制”这个字眼不仅仅指的是对信息的机密性,还包括了文件控制:变更的跟踪和更新。对于多个药品申请,这些信息就会被重复地审阅,不同的评阅者可能基于他们各自的专业技术或原材料的最终用途提出不同的问题,因此这些资料会带着这些问题被再次审阅,并对每一个药品申请又得重复地回答。在NDA或ANDA中包括DMF类型文件信息会显著增加药品申请的篇幅以及FDA审阅者的工作量,这些信息资料必须很好地被控制,一旦发生了变化必须由所有药品申请者加以更新。对于一份DMF文件,信息资料被审阅一次,如果是令人满意的,在两年之内可能不再被审阅,除非最终用户改变或补充了新的信息资料。满意的审阅记录保存在FDA的计算机数据库中,并编入药品主文件。DMF持有者不会收到评阅的复印件,只有在DMF是不完善的情况下,FDA才会与DMF持有者联系。

Y

药品主文件的提交程序

两份 DMF 文件的复印件邮寄至位于 12229 Wilkins Avenue, Rockville, Maryland 20852 的 DMF 机构, DMF 职员审查非技术性信息, 以确保提交文件的完整性, 若缺少关键的内容, 文件室的职员将联系申请的持有者以获得为了申报 DMF 所必要的文件。一旦 DMF 机构决定可接受申请, 该职员会授予 DMF 文件号, 并致信给 DMF 中列出的联系人。

药品主文件的格式

DMF 必须符合格式的要求^[6], 提交的 DMF 文件有正本和副本, 使用政府印刷部门所提供的封面装订、标页码并套上文件夹。多卷册被编号, 纸张必须使用美国标准尺寸纸张, 经常会收到来自英国和印度不同尺寸及质量的纸张, 由于所有页都要装订, 因此左页边距必须不小于 3/4in, 右页边距不小于 1/2in。DMF 提交两份: 一份是蓝封面; 一份是红封面, 文件夹封面从政府印刷部门购买, 是专门为 DMF 机构提供的 (图 1)。



图 1 DMF 文件夹

要求

有关 DMF 的规则列在《联邦法典》第 21 章 314.420 中。另外, CDER 已颁布了有关格式的指南及提供了书写内容的建议, 该指南可在 FDA 的网站中找到 (www.fda.gov)。

DMF 通过参考资料提供信息, 允许持有者授权他人披露信息资料以帮助药品申请。通常, 只有在药品申请者提交授权书给 FDA 时, DMF 才有可能被 FDA 审阅。授权信要求手写, 两份复印件, 上面写有日期、DMF 号、持有者姓名、材料名称、特殊产品、参考数/卷、页数、授权人姓名和证明 DMF 是现行版的许诺声明。附在 DMF 中的这些

信必须有原始签名、印刷体名字, 信笺抬头有该人的头衔, 每封信的复印件提供给药品申请者去提交申请。

申请者并不是在每次提交时都需要新的信件, DMF 持有者通常并不知道申请者为哪种药物活性成分提交了 DMF 信, 管理 DMF 的法规是综合全面的。对于所有的 DMF, 下列内容必须提供: DMF 持有者的名字和地址、公司总部地址、制造及生产厂, 还有与 FDA 通信联系的名字、地址、电话及传真号码, 如果有代理人的话, 再加上代理人的联系信息。在以上内容中每一个人的专门职责必须列入, 标有职务头衔的组织机构图有助于表达此信息, 承诺声明是必需的, 持有者签字的声明可证实 DMF 是现行的, 持有者将按照 DMF 中所叙述的去执行。承诺信、美国代理人的委托信和任何阻止或 cGMP 声明应分页全部提供。

当美国代理商被指定后, DMF 持有者需要提交信函的两份复印件在 DMF 中, 信函中包括了代理商的姓名、地址和职责范围 [管理的和 (或) 科学的], DMF 持有者并不是必须要有代理商, 但对于国外的 DMF 持有者鼓励这样做。持有者或代理人被要求提交档案及副本, 并将变更、增加和删除的信息通报给授权的每一个人。毫无疑问, 持有者应该依照 DMF 所描述的去操作。

DMF 中应包括持有者的名字、地址和电话号码, DMF 题目的叙述, 构成材料列表及构成材料的来源, 检测购入材料、生产过程及放行的标准有时是不同的。在联邦法典 21S314 中列出了五种 CDER 的 DMF 类型, 它们分别是:

- 类型 1, 保留下的 (不再使用, 曾用于设施);
- 类型 2, 药物活性成分、中间体和药品制备中使用的材料;
- 类型 3, 包装材料 (树脂、化合物、着色剂、油墨、元件);
- 类型 4, 药物辅料 (着色剂、矫味剂和原材料);
- 类型 5, FDA 认可的参考信息。

类型 1 的 DMF 已不再使用了, 曾被用来描述设施, 为了能更好地说明现场检查和评阅者的关系, 审阅中心和现场检查达成协议, 将评阅设施的职责转至现场检查人, 企业把关于生产活性药物、包装材料和原材料所用设施的信息转至各自的 DMF 文件中。

类型 2 的 DMF 是针对药物, 也就是常说的活性成分或活性药物成分。每个活性成分都要有单独的 DMF, DMF 中必须包括设施的简要描述、地址、联系人、电话号码和传真号码, 制造设备必须编码登册、列出。若公司不在美国本土, 美国的代理商需要列出活性成分且将公司注册在册, 所填写的地址应与 FDA 注册表上的地址一致, 当美国代理需要注册时, 代理并不需要在这个时候交 DMF 文件。

类型 2 的 DMF 应有制造或合成 (如果是合成的) 的流程图, 包括列出关键工段、过程控制和取样方案。所有原材料的测试、过程控制、包装、放行和稳定性实验都必须提供, 杂质档案、粒度分布、有机挥发性杂质和残留溶剂的测试结果也越加重要, 这些测试方法应参照现行的《美国药典》(USP) 和国际协调委员会 (ICH) 的指南, 在

FDA 审阅时, 这些测试结果常与从最终用户处获得的数据相比较, 验证可靠性。如果数据是不一致的, 这是一个信号, 说明了 DMF 持有者可能没有依照 DMF 去做。多晶现象的实验也日趋重要, 经常有关药品吸收、药品稳定性的问题, 专利纠纷也不断增加。如果不采用 USP 的方法, 那试验方法要进行验证, CDER 的评阅者通过指南和缺陷信已将类型 2 DMF 的信息要求标准化了。

残留溶剂、方法验证、合成路线变更和分析方法的指南都应当被引证在 DMF 中, 从而生成文档。当指南和测试方法发生改变时, DMF 应当为该变化的内容做修正, 并做更新, 将此变化加入到 USP/NF 或 FDA 的标准中。杂质及残留溶剂的标准建立并不能仅基于 ICH/CDER 的指南, 还要建立一个在很低水平上来证明操作控制的标准。

合成路线、工艺及测试方法的变更、标准放宽会对已引用 DMF 的药品申请有很大的影响。这些变更可分成次要变更和主要变更, 制药公司需要做出决定如何报告这些变更, 制药公司应依据变更修改后的操作程序生产新一批的试验药品, 并在新批号产品投放市场之前, 对原已批准的申请进行补充。如果在变更执行之前与最终用户很好地讨论变更内容, 那么这对于 DMF 持有者是最大的好处。未能在 DMF 中说明变更或未通知最终用户, 将会对 DMF 持有者产生负面影响, FDA 可以对国外公司实行禁运, 阻止进口活性成分, 如果 DMF 持有者没有依照联邦法典的要求去做, FDA 可以取消 DMF。

由于项目很不一样, 在类型 3 DMF 中的信息也各不相同。大多数类型 3 DMF 持有者通过了 ISO (国际标准化组织) 认定, 但 ISO 和 CDER 的规则往往是不同的, 目前对于合同包装公司和生产元件或部分元件的公司使用类型 3 DMF 已有所增加。这对于包装 DMF 机构而言, 什么应该提交有些混乱, 类型 3 DMF 中包含了许多不同包装元件的信息, 对于密闭件、塑料瓶、盖、点滴器、塞子等都有单独的 DMF。每一种包装材料应根据预期的用途、成分、组成和放行的控制来进行鉴别, 供应商或用于制造包装材料的各组件的制造商都要提供。应提交用于支持打算使用的包装材料可被接受的数据, 并与代理指南相一致, 毒理数据可编入 DMF 中合适的地方, 在不同处制造的元件应在同一 DMF 中递交, 如在美国两家不同厂家生产的瓶子可在同一份 DMF 文件中, 分别在美国和海外生产的包装用发泡薄膜片也可在同一份 DMF 中, 生产厂家的地址在 DMF 生产厂一节中都将提供。

树脂、着色剂、油墨、化合物、零件、模具、容器系统和包装工艺都使用类型 3 DMF, 在 DMF 中应包含以下内容: 简短的设施描述、处方提供的商品名、通用名、联邦法典 21 非直接食品添加剂参考代码或食品接触号码、化学文摘号码和其他可支持 DMF 的适用参考。DMF 中应列出在组件中化合物的每种化学组成的品质、数量及用途。生产工艺的简要描述, 图纸 (如可适用), 符合功能鉴定的、适应性检测的报告都应当包括在内。检测方法应基于公共标准, 如 ASTM (美国测试与物料协会) 或 USP^[3,4],

包括物理化学性能测试、鉴别和抽提物检测 (USP 或其他)。公司应当详细说明额外的处理方法 (如洗涤), 同时建议简洁描述包装、贴签和标签取样程序。

类型 3 DMF 持有者必须知道要满足附加标准的要求, 某州和组织机构, 如东北政府国会 (CONEG), 加利福尼亚州和新泽西州都有应加以考虑的地方法规。法规对重金属、铅、高价铬、汞及镉都有所限制; 如果使用了硬脂酸盐, 疯牛证明是必需的; 对有机挥发性杂质和残留溶剂的测定可能也会需要。另外, 大多数公司要通过国际海运, 因此国际准则同样适用。DMF 持有者应遵守 FDA 的法规和指南, 保持沟通、管理文件、遵循申请的 cGMP、依照 DMF 执行且确保客户信息流通。

药品申请者的需求也同时要考虑, DMF 提供了所需要的有关器具的所有资料, 这些并不包含在药品提交内容中。标准和要求都包含在 USP^[5]、FDA、CDER 指南和 ICH/CDER 文件中。这些文件覆盖了大部分测试方法, 这些方法用来确保该器具不对药物有副作用和致使其不得使用。越低的成品药风险, 更多的器具及材料标准也就更容易提供足够的信息以满足药品申请者的要求。用于固体口服制剂的高密度聚乙烯瓶标准在《美国药典》〈661〉上颁布, 很快又被修改在〈671〉章节。固体口服制剂是低风险的产品, 自 1970 年起,《美国药典》已收录了这些包装的标准, 并逐步为人们所了解。评阅者和制造厂家都非常了解最终用户对树脂及性能的要求。

塑料或弹性体材料被使用在高风险的产品中, 如吸入制剂、可注射或植入物, 风险较大, 规则也较不明确。FDA 对此方面提供了指南, 但在评阅药品和器具资料之前, 他们可提供的帮助还是有限的。药品申请者往往竭力去检测器具中的抽提物, 但又不知道它们是什么, DMF 持有者在不危及他们产品的前提下尽力满足客户的要求。

最终用户通常并不通知 DMF 持有者关于产品中将会使用什么器具, 药品申请者通常要求得到样品和授权书, DMF 持有者并不知道他们的 DMF 所处的状态, 最终用户如果告知 DMF 持有者最终使用的材料和器具是什么, 将会受益。通过这样做, DMF 持有者能更好地建议最终用户选择哪一种器具以及对它们做过的检测的程度, 申请者可预先提供给 DMF 持有者一系列标准以保证他们购买的东西符合产品要求, 可供选择的方法是设立信任的第三方, 他在 DMF 持有者和药品申请者之间工作, 在双方确认彼此信任的协议下, 就会确保 DMF 信息的连贯性。从 DMF 到药品申请中容器相关章节的信息传递使对 FDA 审阅容易了许多。

类型 4 DMF 不常使用, 对原材料也不需要。多数原材料符合 USP/NF 标准, 仅还需要符合可接受的物理性能测试。类型 4 DMF 往往适用于 USP/NF 标准中没有的香料、片剂着色包衣材料, 无论是着色包衣还是控制释放的包衣毫无疑问都有专利, DMF 程序允许这些有所有权的内容在秘密的情况下被审阅。包衣材料中往往有多组分, 应该提供原材料的品质、处方、制造工艺和放行检测, 以及氧化



Y

铁需要定量测定。DMF 中对这些物料中铁的含量进行测定工作是可取的。

所有 DMF 都需要连续的工作, DMF 持有者被要求做年度汇报, 将 DMF 中的变更告知药品申请者, 如果 DMF 中有增加、删除或变更, DMF 持有者必须通知每一个授权参考 DMF 的公司; 如果持有者改变了工艺或 DMF 中所列的文件, 则 DMF 也必须改变。

一旦发生了变更, 如有必要, 双方对变更的影响、报告变更的方法、FDA 审阅变更的时间, 都必须有明确的认识。变更依据 cGMP 和 CDER 的指南应当有所分类, 如果 DMF 持有者不确定变更的分类或用何种方式向药品申请者汇报变更, 在此强烈推荐在变更发生前由 DMF 持有者联系顾问或代理讨论该项变更, 充分的信息应当提供给代理以便使 FDA 做出慎重的决定。在每年准备文件时, 持有者要更新 DMF, 包括授权名单、制造程序、设计、供应商、检测和致其他 DMF 的授权信等的变更, 并提供更新的已发出授权信的名单, 未能更新这些内容会导致药品审批的延迟。FDA 在下列情况下可停止 DMF: 未能提供每年的经授权可阅览信息的人员名单, 未能提供变更情况, 未能提供证明 DMF 是现行的声明。

基于经验和最新的信息, FDA 总是经常更新规范, 并颁布修改后的政策和指南, DMF 持有者和药品申请者应保持警觉, 这一点很重要。文件和规范在日常生活中应当经常被回顾, 并在规则、规范和指南中及时更新, 以便与变化保持一致。

结论

药品主文件是支持药品申请的关键文件, DMF 有缺陷

可能会导致药品申请的延误。DMF 应及时地提交, 并且用来完成它的标准是与药品申请一致的, 这是很重要的, DMF 可看成是药品申请的扩充, 当所需要的信息从 DMF 流向药品申请时, 那么药品审评过程将进展顺利。

参考文献

1. Food, Drug, and Related Law as Amended Through December 31, 2000, Prepared for the use of the Committee on Energy and Commerce, U.S. House of Representatives; U. S. Government Printing Office; Washington, DC, 2001.
2. Code of Federal Regulations Title 21 § Parts 300 to 369, Parts 300 to 499, Office of Federal Register, National Archives and Records Administration (current version); Government Printing Office; Washington, DC, 2001.
3. Code of Federal Regulations Title 21 § 314.420, Drug Master Files, Parts 300 to 499, Office of Federal Register, National Archives and Records Administration (current version); Government Printing Office; Washington, DC, 2001.
4. GUIDELINE FOR DRUG MASTER FILES, Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Office of Drug Evaluation I (HFD-100), 5600 Fishers Lane, Rockville, Maryland 20857, September 1989.
5. USP, United States Pharmacopeial Convention, Inc. 12601; Twinbrook Parkway; Rockville, MD, 20852.

(傅 民 译)

药物不良反应

Therese I. Poirier

Robert L. Maher, Jr.

Duquesne University, Pittsburgh, Pennsylvania, U. S. A.

引言

药物不良反应 (ADR) 属于药物不良事件 (ADE) 的范畴^[1]。ADE 包括 ADR、错误用药及其他与药物相关的问题。ADE 是药物事故的负面结局。Henri Manasse 将药物灾害定义为医源性危害, 这是一种当需要进行药物治疗时就固然存在的风险。本章集中讨论 ADR。

定义

世界卫生组织 (WHO) 及 Karch 和 Lasagna 关于 ADR 的定义十分相似。ADR 是一种意外的、对人体有害的药物反应, 出现在用于预防、诊断或治疗的正常剂量的情况下, 但应排除不能达到预期目标的情况^[2]。美国食品与药品管理局 (FDA) 重点关注引起意外反应和 (或) 致使病情更为严重的 ADR。这类 ADR 包括: 致使患者的结局为死亡、致命、住院治疗、致残、先天畸形或必须采取干预措施以避免永久性的损害或损伤^[3]。医疗卫生机构认证联合委员会 (JCAHO) 关注严重 ADR 的报告。那些导致疾病出现、必须进一步治疗、必须延长住院时间、暂时性或永久性致残或导致死亡的不良事件必须上报 FDA^[4]。美国卫生系统药师协会 (ASHP) 将严重 ADR 定义为任何意外的、非目的性的、非愿望中的或是过度的药物反应, 包括以下几个方面:

- 需要停药;
- 需要改变药物治疗方案;
- 需要更改剂量;
- 必须入院治疗;
- 致使住院时间延长;
- 必须予以支持治疗;
- 明显增加诊断难度;
- 给以后带来负面影响, 或导致暂时性或永久性伤害、致残或死亡^[5]。

ASHP 的定义未包括因药物戒断、药物滥用、中毒或药物并发症所引起的药物反应。

ADR 可能包括的其他术语有副作用、药物不耐受、特异质反应、毒性反应、变态反应或过敏反应^[6]。副作用是指非目的性的、非愿望中的但已知的药物药理学作用, 且可以预测其发生频率。有些药物会使患者治疗稍微改变或不改变。药物不耐受是一种致使患者管理出现轻微变化或无变化的轻度药物反应。特异质反应是在常规剂量下出现的一种意外反应。毒性反应是一种可预见的反应, 多因超

过药物的推荐剂量或体内药物浓度过高所致。变态反应或过敏反应是人体对某种药物异常敏感所出现的一种反应, 属于免疫系统反应。

分类体系

可以采用四种分类体系描述 ADR^[1,7]。根据药物的药理学作用, 将 ADR 分为 A、B、C、D 四级反应类型。A 级反应是指被放大的但仍属正常的药物药理学作用。它们是可预知的, 且呈剂量依赖性; B 级反应不可预知的、由已知的药物药理学作用所致, 且与剂量无关。大部分的 B 级反应都属于过敏性的或与免疫系统相关的。这类反应可进一步细分为以下几个类型: I 型 (IgE 介导的反应)、II 型 (IgG 或 IgM 介导的细胞毒性反应)、III 型 (IgG 介导的免疫复合反应) 和 IV 型 (细胞介导的免疫反应); C 级反应是由于长期用药产生的反应; D 级反应是延迟的药物效应, 如致癌或致畸作用。

另外, 也可根据剂量关系对 ADR 进行分类, 即分为剂量相关性和非剂量相关性两类反应。还有一种分类体系是根据不良反应与药物之间的因果关系进行分类。以 Naranjo 的描述为基础的分类法是应用最为广泛的因果分类法之一。这种分类包括肯定 (看来药物就是真正的原因)、很可能 (药物是明显的原因)、可能 (似乎与药物有关) 及不太可能 (看来药物不是原因)。第四种分类体系则以损伤程度或反应的严重程度为依据进行分类, 分为轻度反应 (暂时性的不适且可以耐受)、中度反应 (明显不适) 及严重反应 (潜在的致命性或导致永久性的残疾或死亡)。

发病率

ADR 在一般人群中的发生率不得而知, 但对于部分特定的患者人群, 有关新 ADR 的发生率已有所报道。对 39 项前瞻性研究进行的 Meta 分析提示, 在住院患者中, 严重 ADR 的总发病率为 6.7%, 而致命性 ADR 的总发病率为 0.32%^[8]。在美国, 这一致死率使 ADR 位居主要死亡原因中的第 4~6 位。另一个包括了 36 项研究的 Meta 分析显示, 约 5% 的住院患者因 ADR 而入院^[9]。据估计, 美国每年的医院直接成本中 ADR 的费用为 15.6 亿~40 亿美元^[10]。

ADR 的诱因

出现药物不良反应的两大诱因有药物本身和患者因素。与药物相关的因素包括剂量、剂型、给药系统及药物间的



相互作用。与患者相关的因素包括年龄、疾病状态、遗传因素、性别、营养因素、联合用药及草药疗法。

1. 与药物相关的因素

1.1 剂量

ADR 可能是因摄入的药量过多所致。剂量问题尤其容易出现在治疗指数较窄的药物中。这类药物包括：地高辛、抗凝血剂、抗惊厥药物、抗心律失常药、抗肿瘤药、支气管扩张剂、镇静药及催眠药等^[11]。

1.2 剂型与给药系统

许多与剂型及给药系统相关的 ADR 都是因局部刺激或过敏反应所致^[12]。胃肠 (GI) 道的局部刺激可出现在口服剂型的药物中。例如，引起口腔溃疡的毒性与抗肿瘤药有关。此外，如果食道传输被延迟，使用一些如缓释剂类的制剂会加重食道的损伤。例如，氯化钾的控释蜡模锭与严重的食道糜烂有关。已确定的可诱发食道损伤的因素包括：大体积的薄膜衣片、胶囊和大体积的缓释剂、速溶剂及睡前用少量水送服的固体口服药^[12]。

局部组织刺激可见于肌肉 (IM) 给药。尤其是当制剂的 pH 与周围组织的 pH 不同时，或难溶性药物出现沉淀时，这种问题就容易出现^[12]。错误的选用 IM 注射给药很可能是引起局部不良作用的最主要因素。由于酒精、非离子表面活性剂及黏合剂的存在，经皮给药系统也可引起局部的皮肤刺激。

过敏反应可能因药物中存在污染物或赋形剂所致。例如，嗜酸性粒细胞增多——肌痛综合征的出现与口服了各类药物中的色氨酸污染物有关^[12]。又如，过敏反应可由紫杉醇 (Taxol 泰素) 中使用的表面活性剂 Cremaophor EL 所致。

已有文献证实与使用防腐剂有关的直接毒性作用。例如，婴儿严重的代谢性酸中毒和死亡与苯甲醇有关，苯甲醇是一种溶于生理盐水中用来冲洗导管的抑菌类防腐剂^[12]。

使用特殊的静脉 (IV) 输液设备同样可引起 ADR。例如，使用塑料输液器静脉输注硝酸甘油会因为药物可渗透至塑料管内而引起疗效不足^[12]。

当患者转而使用非专利产品时，制剂因素，如生物利用度方面的差异也可导致 ADR。例如，抗惊厥药和甲状腺制剂就曾经导致过严重的不良反应^[12]。

1.3 药物间的相互作用

据估计，6.9% 的 ADR 源于药物间的相互作用^[6]。引起药物间不良相互作用最可能的原因是药物动力学的改变，药物动力学改变可导致药物代谢或排泄的改变，或是药效学的改变，这种改变又可引起药物的协同或附加作用。

2. 与患者相关的因素

年龄、疾病状态、遗传因素、性别、营养状况、联合

用药及草药疗法均为与患者相关的因素，这些因素都可能对药物不良反应有所影响。

2.1 年龄——老年

与年龄相关的药物动力学和药效学改变可能会影响老年患者对某些药物的反应，也可能增加老年患者对 ADR 的易感性^[13~15] (表 1)。老年患者出现 ADR 的风险大小可能并非仅与年龄相关。ADR 可能更多地与患者的虚弱程度及病情有关^[15]。老年患者平均至少存在 5 种或 5 种以上的合并疾病，这些疾病可能会增加出现不良反应的风险。在老年患者中，多药治疗的问题似乎更为普遍。老年患者每年平均接受 4.5 种药物的长期治疗，服用的药物可填满 13 张处方^[15]。老年患者的体内平衡机制有所衰退，而体内平衡机制失衡以及功能储备的衰退可导致患者对药物的耐受能力及应对紧张局面的能力下降，从而使患者出现 ADR 的风险更大^[16]。

表 1 老年患者中与年龄相关的药物代谢动力学改变

药物代谢动力学阶段	药物代谢动力学参数
胃肠吸收	多数药物：被动扩散过程无变化、生物利用度无变化
	某些药物：↓主动运输、↑生物利用度
	↓首过效应、↑生物利用度
分布	水溶性药物：↓分布体积、↑浓度
	脂溶性药物：↑分布体积、↑半衰期
	高血浆蛋白结合药物：↑或↓游离药物分数
氧化药物	某些 I 相反应：↓清除率、↑半衰期
	高清除率药物：↓清除率、↑半衰期
	经肾脏排泄
肾脏排泄	经肾脏排泄药物：↓清除率、↑半衰期

注：↓减少；↑增加。

2.2 年龄——儿童

引起儿童 ADR 风险增加的两大因素为药物动力学改变以及给药剂量的问题。已有文献证实，在儿童中存在着与年龄相关的药物动力学差异^[17]。然而在这类人群中，疗效及安全性方面的资料很有限，甚至或完全就没有进行过研究。因此，尚不清楚此类人群是否存在 ADR 风险增加的情况。如果不适当考虑药物动力学方面的变化，那么就存在 ADR 增加的潜在风险^[18]。

值得注意的是，在经 FDA 批准的药物中仅有 1/4 特别指出了儿童的适应证^[17]。用于成人的药物常常在缺乏 FDA 安全性及疗效资料的情况下，直接用于儿童。那些为成人设计的剂型的兼容性和稳定性发生改变后（如稀释或再配制），可导致 ADR 风险增加。

研究新生儿、儿童及青少年中与年龄相关的差异将有助于预防儿科 ADR 的出现^[18] (表 2)。尚需深入研究儿科



用药以预防 ADR。

表 2 儿童患者中与年龄相关的 ADR 风险因素及原因^[7]

新生儿
出生前药物的胎盘转运
药物作用改变
药物动力学改变
经皮吸收增加
肝/肾功能减退
血浆蛋白结合率降低
多种药物联用
有关药物在危重患儿及早产儿中的作用的资料有限
儿童
药物的反常效应（抗组胺药的兴奋作用而非镇静作用）
液体剂型的赋形剂
糖作为甜味剂
丙二醇作为溶剂
大量的静脉内灌注
采用抗生素治疗病毒感染
神经及躯体发育中断
青少年
自我寻找
使用或误用设备（如棉球）
使用或误用处方和非处方药物
对药物说明的依从性差
多种药物联用
娱乐性服用酒精和违禁药品
药物改变激素水平

2.3 合并疾病

某些疾病，如肝病或肾病可影响 ADR 的发病率，因为它们可以改变药物的药物动力学过程，如吸收、分布、代谢或排泄^[6]。

2.4 肝脏疾病

在肝病患者中，由于经肝脏代谢的药物的肝清除率下降，或由于敏感性增强，这类患者对某些药物的易感性也随之增加^[6]。例如，肝代谢受损可使接受茶碱、苯妥英或利多卡因治疗的患者突然出现中枢神经系统（CNS）毒性，或使接受麦角胺治疗的患者出现麦角中毒^[19]。

肝病者还面临着对药物的敏感性增加的问题^[19]。由于肝病患者对维生素 K 的吸收率下降或维生素 K 依赖性凝血因子的生成减少，因此使用抗凝剂会增加出血的风险。在严重的肝病患者中，因使用吗啡或巴比妥类药物也会增加出现呼吸抑制及肝性脑病的风险。大量使用利尿剂可诱发肝昏迷的突然出现，因为肝脏疾病本身就会引起钾的丢失。由于肝脏疾病会降低糖原的生成，因此服用磺脲类降糖药后出现低血糖的风险也随之增加。

由于肝脏疾病减少了白蛋白的肝内合成，因此还可导致低白蛋白血症。对于那些与白蛋白广泛结合的药物，如苯妥英，由于游离药物浓度的增加，出现药物毒性的风险也加大。

尚无有效的方法可以对肝病的程度进行量化以帮助调整用药剂量。一些可行的方法包括检查患者的凝血酶原时间是否延长、胆红素水平是否升高和（或）白蛋白水平是否下降。如果出现了这些情况，那么就应该避免使用在肝病患者中药物反应会改变或可能导致肝脏毒性的药物。

2.5 肾脏疾病

对于经肾脏排泄的药物，肾功能受损可增加其 ADR 的发生率。不同于肝脏疾病的是，通过采用药物动力学剂量原则，可以将不良反应的风险降到最低。

在肾脏疾病中，引起 ADR 风险增加的机制包括药物排泄的延迟、由低白蛋白血症引起药物与蛋白的结合率下降以及患者对药物的敏感性增加^[6]。肾脏排泄延迟是导致药物毒性增加的原因之一，如氨基糖甙类药物、地高辛、万古霉素、氯磺丙脲、H₂ 受体拮抗剂、别嘌呤醇、锂盐、胰岛素、氨甲叶酸等^[20]。在肾衰竭期间，某些药物的毒性代谢物的蓄积是导致 ADR 的原因。例如，杜冷丁的毒性代谢物去甲哌替啶就会在肾衰竭患者中蓄积^[20]。

体内存在尿毒症毒素蓄积的患者，对某些药物的敏感性将会增加。这类患者对 CNS 抑制剂（如巴比妥类药物和苯二氮草类）的反应可能会增加，也可能加强阿司匹林及华法林的出血效应以及其他用于抑制血小板聚集的抗生素的出血效应，如羧苄青霉素、替卡西林及哌拉西林。

2.6 其他疾病

理论上，与低白蛋白血症相关的其他疾病会使患者更容易出现不良反应，也更容易改变人体对高蛋白结合药物的反应^[21]（表 3）。

表 3 与低白蛋白血症相关的因素

衰老	肝脏疾病
烧伤	肾病综合征
癌症	营养不良
心力衰竭	妊娠
失蛋白性肠病	肾功衰
炎性疾病	脓血症
损伤	压力
不动	手术

其他疾病的存在同样也可以影响 ADR 的风险。在某些病理生理学基础存在的情况下，许多不良作用均与药物延伸的药理作用有关。表 4 列举了大量的例子^[6]。



表 4 疾病对药物不良反应的影响

疾病	药物	不良反应
胃肠道疾病		
消化性溃疡	阿司匹林、皮质类固醇激素、非甾体类抗炎药	溃疡出血或穿孔的风险
心血管疾病		
心力衰竭	β -受体阻滞剂 利多卡因、茶碱	加重或突然出现心衰 毒性增加——癫痫发作
心肌缺血	三环类抗抑郁药	心率、心脏节律及传导紊乱
	地高辛	心律失常
心动过缓	β -受体阻滞剂 奎尼丁	心跳停止
高血压	口服避孕药、血管收缩药 吩噻嗪类药物、硝酸盐类药物 三环类抗抑郁药	血压升高 血压下降
血液病		
出血障碍——血友病	阿司匹林	出血风险增加
神经系统疾病		
重症肌无力	氨基糖苷类药物 奎尼丁、奎宁	肌无力加重 瘫痪
癫痫	吩噻嗪类药物 三环类抗抑郁药	癫痫发作阈值下降
脑血管疾病	麦角胺	缺血性发作
风湿性疾病		
系统性红斑狼疮	药物	通常都会增加药物

续表

疾病	药物	不良反应
高尿酸血症	噻嗪类利尿剂、速尿	不良反应的发生率 痛风发作
呼吸系统疾病		
哮喘	β -受体阻滞剂	急性支气管痉挛
呼吸功能不全	麻醉性镇痛剂	肺通气不足、呼吸暂停
内分泌疾病		
糖尿病	噻嗪类利尿剂、速尿、皮质类固醇激素、口服避孕药	高血糖、血糖控制的难度加大
甲状腺功能减退	地高辛	反应增强
甲状腺功能亢进	口服避孕药 地高辛	反应增强 反应降低
眼科疾病		
狭角型青光眼	副交感神经抑制剂	青光眼发作

曾对药物出现过异常反应的患者也更容易出现 ADR^[22]。伴有过敏史的患者因其具有遗传性的形成免疫球蛋白 E 的能力，因此其出现 ADR 的风险也更大。

2.7 遗传因素

遗传因素也可导致部分 ADR 的出现，这是因为遗传因素可引起药物动力学或组织反应性的改变。由于药物水解、乙酰化以及肝内氧化方面出现了变化，药物的代谢过程也随之改变。改变后的药效学反应可以在数量上呈放大的反应形式，也可表现为性质上的改变。至于将出现何种反应类型，这是人们所无法预测的。表 5 列出了部分因遗传因素所致的药物反应方面的改变^[6]。

表 5 遗传因素与药物反应的改变

遗传机制	药物	药物不良反应
药物动力学		
血浆假胆碱酯酶水平降低	琥珀酰胆碱	延长神经肌肉阻滞作用，导致呼吸暂停
慢乙酰化	异烟肼	周围神经病变的发病率增加 类 SLE 综合征的发病率增加 更易出现苯妥英钠毒性
	肼屈嗪、普鲁卡因胺 苯乙肼、柳氮磺吡啶	类 SLE 综合征的发病率增加 更易出现副作用
快乙酰化	异烟肼	更易出现肝炎
环氧化物水解酶缺乏	苯妥英钠、卡马西平、苯巴比妥	由于毒性中间产物的大量堆积导致致命性超敏综合征

续表

遗传机制	药物	药物不良反应
药效学		
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G-6-PD) 缺乏	阿司匹林、BAL (二巯丙醇)、氯霉素、氨苯砜、羟氯喹、萘啶酸、呋喃妥因、伯喹、丙磺舒、奎宁、奎尼丁、磺胺类药物	溶血性贫血
高铁血红蛋白还原酶缺乏	对乙酰氨基酚、局部麻醉药、苯佐卡因、氯喹、氨苯砜、亚硝胺、伯喹、磺胺类药物	高铁血红蛋白血症
钙调节异常	全身麻醉药 (氟烷)、肌肉松弛剂 (琥珀胆碱)	恶性高热

2.8 性别

有报道称,与男性相比,女性的 ADR 发病率更高^[6]。出现这一观察结果的原因之一是女性较之男性服用的药物更多。目前尚无资料证实任何与性别相关的药物药动学方面的差异。其他报告并不支持女性的 ADR 发病率高于男性这一结论。因此,单纯的性别因素不太可能是引起 ADR 的主要决定性因素。

2.9 营养因素

营养因素也是导致 ADR 的原因之一。这类因素包括药物与营养物之间的相互作用以及与营养状况相关的药物动力学改变。

某研究报道称,在一家教学医院进行的调查显示,临床意义重大的药物-营养物相互作用的发生率相当低(0.4%)^[23]。引起药物-营养物相互作用的三大机制可能为:干预药物吸收、改变药物排泄、影响药物活性。例如,铁、钙、镁可与四环素发生螯合作用,使四环素的吸收率降低。对尿液有酸化或碱化作用的食物可影响药物的排泄。含有大量维生素 K 的食物可抑制华法林的活性。表 6 列出了部分重要的药物-营养物相互作用^[23]。文献 [24] 为一篇有关药物-食物相互作用的回顾性临床评价文章^[24]。

表 6 重要的药物-营养物相互作用^[23]

药物	营养物	相互作用
苯妥英钠	酒精	苯妥英钠的代谢过程加快
	经肠营养	苯妥英钠的吸收率降低
四环素	奶制品	影响药物的吸收
茶碱	咖啡因	产生潜在的毒性作用
华法林	富含维生素 K 的食物	抗凝血反应减弱
氯磺丙脲、甲苯磺丁脲、妥拉磺脲、醋酸己脲、甲硝唑	酒精	戒酒硫样反应
Trancylcypromide	富含酪胺的食物	高血压危象

续表

药物	营养物	相互作用
双硫仑	酒精	恶心、视力模糊、胸痛、眩晕、晕厥
螺内酯	富含钾的食物	高钾血症

在肾衰竭患者中,药物-营养物相互作用的临床意义可能更为重大。文献 [25] 为一篇有关在肾衰竭患者中,药物-营养物相互作用的回顾性评价文章^[25]。

营养状况可影响药物的药动力学过程。营养不良可导致以下情况的出现:①肝脏及肾脏改变可影响药物的消除;②消化系统的改变可影响药物的吸收;③心脏改变可影响血流量;④激素水平的改变可影响代谢性酶系统以及药物结合蛋白;⑤血浆、组织蛋白以及身体成分的改变可影响蛋白的结合与清除;⑥矿物质及电解质的改变可影响药物代谢及蛋白结合;⑦组织改变可影响药物的摄取以及药物-受体相互作用^[26]。

2.10 联合用药

大量的流行病学研究表明,多药物联用与 ADR 之间存在着密切的因果关系。研究提示,使用的药物越多,出现 ADR 的风险就越大^[27]。经医务人员认可的用于减少多重用药的固定的联合用药方案可降低出现 ADR 的风险。

2.11 草药疗法

20 世纪 90 年代,草药疗法的应用范围迅速扩大。据估计,自 20 世纪 90 年代初期以来,草药的销售额每年可高达 40 亿美元,且仍在以每年 20% 的速度增长^[28]。患者常常错误地认为,既然这类草药制品是天然的,那么也就不存在处方药所具有的那些潜在危害。由于草药制剂的上市销售并未通过 FDA 的严格审查,也没有 FDA 对此制定的指导意见,因此有关其疗效、不良反应及药物间相互作用的循证资料非常有限。近期,有两篇文章对最常用的草药制剂引起 ADR 的现有资料进行了回顾性评价^[28,29]。在现有的报告中,许多文章都未记录某种草药与其引起的特定的 ADR 在时间上的关联。

大多数情况下,草药制剂并不能替代已经验证的处方

或非处方药。患者应该意识到，医务人员是无法保证草药制剂的安全性及一致性的。患者应将推荐的有效剂量作为初始剂量开始用药，一旦出现了任何异常的副作用，应及

时告知医务人员。患者应经常向药剂师咨询可能出现的药物-草药之间的相互作用。表 7 列出了十种最常用草药的副作用以及可能产生的药物间相互作用。

表 7 十种最常用草药的 ADR

草药名称	常见用途	副作用及药物相互作用
紫锥花	防治上呼吸道感染及普通感冒	皮疹、瘙痒、眩晕、对免疫系统尚不清楚的长期影响
贯叶连翘	轻中度抑郁	胃肠道刺激、光敏反应；与以下药物联用可引起轻度的血清素综合征： 帕罗西汀、曲唑酮、舍曲林及奈法唑酮 可降低地高辛的血清水平 可降低环孢霉素的血清浓度 与口服避孕药联用——突破性出血
银杏	痴呆	轻度胃肠道抑制、头痛。可影响到华法林（INR 升高） 与阿司匹林产生药物间相互作用（自发性前房出血）
大蒜精	高血压、高胆固醇血症	胃肠道刺激、胀气、反流、恶心、过敏反应及抗血小板作用
锯棕榈	良性前列腺增生	不常见
人参	改善一般健康状况、性功能、竞技能力、体能、生殖能力	大剂量用药可导致腹泻、高血压、失眠、神经过敏； 可影响到华法林（INR 降低）；
白毛茛	上呼吸道感染、普通感冒	腹泻、高血压、血管收缩
芦荟	外用可用于皮炎、疱疹、伤口愈合及牛皮癣；口服可用于便秘	外用可延迟伤口的愈合 口服可引起腹泻及低钾血症
西伯利亚人参	与人参类似	可提高地高辛的血清水平 可影响到华法林（INR 升高）
缬草	失眠、焦虑	乏力、震颤、头痛、异相睡眠（建议不要与其他镇静催眠药合用）

药物不良反应报告体系

WHO、FDA、JCAHO 及美国卫生保健财政管理局（HCFA）均提出并要求卫生保健机构建立一项 ADE 的监测与报告体系。这种监测体系是药物上市后监测 ADR 的手段之一。JCAHO 要求所有经认证的卫生保健机构都建立一套持续的药物监测计划^[4]。建立 ADR 监测与报告体系的目的是：协助对 FDA 批准的药物进行上市后监测，并找出可降低 ADR 风险的方法。所有这些报告体系的主要重点都是为了协助促进药物使用程序的不断完善。

1. ADR 筛查方法

目前有关 ADR 最佳的筛查方法尚无定论，但现已提出了多种筛查方法。值得一提的是，各类文献基于临床资料，重点强调了五种筛查方法^[30~34]。这五种筛查方法包括：①“追踪药”，如解毒药，像维生素 K 和苯海拉明；②“治疗范围窄的药物”，如追踪华法林和地高辛的实验室测值；③用药的变化，如停药或减量的药物记录；④医疗记录中已确诊的 ADR，如病历审查或审查 ICD-9CM（《国际疾病

分类》第 9 版，临床修订）编码；⑤ADR 计算机报告追踪体系。虽然每一种 ADR 筛查方法都有详细的描述，但有关这些筛查方法效率的资料目前还十分有限。

2. 药物流行病学研究体系

药物流行病学研究的目的是检测 ADR^[35,36]。多种体系都采用了药物流行病学方法。这包括自发报告、研究治疗类型及研究特定的临床综合征。

2.1 自发报告

目前，自发报告是检测 ADR 的主要途径^[37]。它以下述三种形式出现：

- 作为临床试验的组成部分，上报给 FDA；
- 医务人员报告给医学杂志；
- 患者自行报告给药品生产商或 FDA^[38]。

用于新药研发的临床试验并不能发现药物在安全性方面可能出现的所有问题。Ⅲ期临床试验的局限之处包括：样本量相对较小、试验持续时间短、受试人群受限（如通常排除了老年及儿童患者）、患者病情偏于简单（如疾病状态有限）以及药物不良反应的检测效力有限^[30]。因此，



FDA 在很大程度上都依赖于可疑 ADR 的自发报告^[39]。自发报告在药品上市后早期十分重要，它可以确定之前未能发现的那些药物反应。在过去的几年中，由于大量的新药上市，情况尤其如此，而现在这些药品都加注了“黑框警告”。例如，瑞易宁（Rezulin®）和特洛凡（Trovan®）均与肝脏毒性有关，且都加注了“黑框警告”。

自发报告体系的其他优点还包括能够发现极为罕见的 ADR 并确定高风险亚组。为了扩大自发报告体系的上报途径，FDA 建立了药物监视（MedWatch）系统。借助这一系统，可通过传真（1-800-FDA-1078）或电话（1-800-FDA-1088）向 FDA 报告^[40]，还可通过登录“MedWatch Online”网站（<http://www.fda.gov/medwatch/>）报告药物的不良反应。

FDA 自发报告体系的局限性包括报告过度及报告不足。

最近批准的部分药物出现了报告过度的情况，这可能是因提高了这些药物的公开程度。

2.2 研究治疗类型

采用观察性队列研究或病例对照设计以确定 ADR 与某些特定的治疗类型之间的关系^[36,41]。医疗索赔资料常用于这些研究中，因为缺乏药物暴露及其他潜在混杂变量的确凿证据，所以应确保谨慎行事^[38]。但这些研究的确有利于确定某些特定治疗类型的 ADR 风险（如 NSAID 类药物与消化性溃疡病风险）^[42]。

2.3 研究特定的临床综合征

观察性队列研究或病例对照设计也可用于研究药物暴露与某些特定疾病状态或综合征之间可能存在的因果关系^[36,41]。对于在某个特定人群中检测 ADR，这类研究尤为有用，如老年或儿童患者，而Ⅲ期临床试验常将这类患者排除在研究对象之外。但这类研究通常采用的也是行政数据，这正是其缺陷所在。这些数据在确定潜在混杂变量与 ADR 之间的因果关系方面，可确保存在这类问题的风险^[38]。

3. 药物不良反应的评价

一旦发现某种可能存在的 ADR 就需要对此做出因果关系评价。能够对 ADR 的原因做出不可能、可能、很可能或肯定的分级判断十分重要。确定因果关系的一大困难是混杂变量的存在使得因果关系评价更加复杂^[43]。为了明确因果关系，需要许多重要的数据点，包括该不良事件的性质、可疑药物的名称、其他潜在的原因以及该药物与不良事件在时间上的关系。潜在原因可通过研究病史、查体结果及导向性的诊断性检查而获取。

因果关系的判定可简单地通过医务人员的临床推理及判断来进行。这种方法的主要缺点是对 ADR 的因果关系，评分者间及评分者内的一致性不高^[44,45]。

ADR 因果关系评分法则通过一系列的临床问题来解决

评分者间及评分者内的信度问题。例如，Naranjo 评分法则由一系列的临床问题组成，重点包括：时间及剂量-反应关系、ADR 与既往临床报告或患者既往经历的一致性、安慰剂反应、停药及再投药、中毒性血药浓度、引起该反应的其他原因，以及该事件是否经客观证据确认^[44]（表 8）。许多医疗卫生机构及 FDA 均采用了某种因果关系评分法则以将不同评分者之间的分歧最小化，提高评分者间及评分者内的一致性。

表 8 Naranjo ADR 因果关系评分

	是	否	未知	得分
1. 关于此不良反应，以前是否曾有结论性的报告？	+1	0	0	
2. 此不良事件是否出现在予以可疑药物之后？	+2	-1	0	
3. 此不良反应是否在停药或予以特异性拮抗剂后有所改善？	+1	0	0	
4. 停药后再度予以该药，此不良反应是否再次出现？	+2	-1	0	
5. 是否有其他因素（非药物因素）可能引起此不良反应？	-1	+2	0	
6. 予以安慰剂后，此不良反应是否再次出现？	-1	+1	0	
7. 该药物的血液（或其他体液）浓度是否已达中毒浓度？	+1	0	0	
8. 该药物的剂量是否与这一不良反应的严重程度成正比？	+1	0	0	
9. 患者以前是否曾对该药或该类药产生过类似的不良反应？	+1	0	0	
10. 是否有客观证据证实该不良事件？	+1	0	0	
总分				

注：可能性分级评分：肯定，≥9 分；很可能，5~8 分；可能，1~4 分；可疑，≤0 分。

药物不良反应的预防

ADR 之所以值得重视，是因为它可以导致发病率和死亡率明显上升。由于约 95% 的 ADR 都属于 A 级（可预知的）反应，因此只要采取有效的完善措施，ADR 是可以避免的，也是可以预防的^[46]。加深对致病因素的认识，提高患者教育的水平将有助于预防 ADR。ADR 的其他预防途径还包括：完善对过敏反应的文件记录（如通过计算机追踪）、发现新的方法以提高患者的依从性、采取措施以提高药品处方及给药的规范性。

1994 年，ASHP、美国医学会（AMA）及美国护士协会（ANA）共同制定了以下的系列推荐意见，以预防医疗卫生系统中 ADR 的出现：

- 医疗卫生系统应建立一整套程序,使得处方者可以将处方药物直接输入到电脑系统中;
- 医疗卫生系统应在其电脑处方程序中,评价机读编码(如条形码)的作用;
- 医疗卫生系统应建立更加完善的药物不良事件监测与报告体系;
- 医疗卫生系统应采用单位剂量药品发放与药房统一发放静脉用药相结合的体系;
- 医疗卫生系统应分派药师到患者治疗区实地工作,与处方者及给药者进行直接交流合作;
- 医疗卫生系统应将用药失误视为工作体系的失败,并寻找相应的解决办法加以预防;
- 医疗卫生系统应确保所有的处方药物在首剂给药之前都通过了药师的例行审查,并确保所有的处方者、药师、护士及其他工作人员在发现了用药安全方面的问题时,都会寻找相应的解决办法^[47]。

结语

药物不良反应在药学知识领域是一个非常重要的组成部分。目前已经发现了多种可诱发 ADR 的药物及患者因素。用于筛查及评价 ADR 的报告体系加深了人们对风险因素的认识,也有助于 ADR 预防体系的全面完善。

参考文献

1. Schumock, G.; Guenette, A. Adverse Drug Events. Pharmacotherapy Self-Assessment Program; Carter, B., Ed.; ACCP; Kansas City, MO, 1999; 5, 103—130.
2. Karch, F. E.; Lasagna, L. Adverse Drug Reactions: A Critical Review. JAMA 1975, 234, 1236—1241.
3. Rossi, A.; Knapp, D. Discovery of New Adverse Drug Reactions. A Review of the Food and Drug Administration's Spontaneous Reporting System. JAMA 1984, 252, 1030—1033.
4. Joint Commission on Accreditation of Health Care Organizations. 1998 Comprehensive Accreditation Manual for Hospitals; A. M. H.; Oakbrook Terrace, IL, 1997.
5. American Society of Health-System Pharmacists. Suggested Definitions and Relationships Among Medication Misadventures, Medication Errors, Adverse Drug Events and Adverse Drug Reactions. Am. J. Health-Syst. Pharm. 1998, 55, 165—166.
6. Edwards, I. R. Pharmacological Basis of Adverse Drug Reactions. Avery's Drug Treatment; Speight, T., Holford, N., Eds.; ADIS International LTD; Auckland, New Zealand, 1997; 261—299.
7. Young, L. R.; Wurtzbacher, J. D.; Blankenship, C. S. Adverse Drug Reactions; A Review for Healthcare Practitioners. Am. J. Managed Care 1997, 12, 1884—1906.
8. Lazarou, J.; Pomeranz, B.; Corey, P. Incidence of Adverse Drug Reactions in Hospitalized Patients. JAMA 1998, 279 (15), 1200—1205.
9. Einerson, T. Drug-Related Hospital Admissions. Ann. Pharmacother. 1993, 27, 832—840.
10. Clasen, D. C.; Pestonik, S. L.; Evans, R. S.; Lloyd, J. F.; Burke, J. P. Adverse Drug Events in Hospitalized Patients: Excess Length of Stay, Extra Costs, and Attributable Mortality. JAMA 1997, 277, 301—306.
11. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics; Shargel, L., Yu, A., Eds.; Appleton and Lange; Stamford, CT, 1999.
12. Uchegbu, I.; Florence, A. Adverse Drug Events Related to Dosage Forms and Delivery Systems. Drug Safety Concepts 1996, 14 (1), 39—67.
13. Swift, C. G. Pharmacodynamics; Changes in Homeostatic Mechanisms, Receptor and Target Organ Sensitivity in the Elderly. Br. Med. Bull. 1990, 46, 36—52.
14. Parker, B. M.; Cusack, B. J.; Vestal, R. E. Pharmacokinetic Optimisation of Drug Therapy in Elderly Patients. Drugs Aging 1995, 7, 10—18.
15. Gurwitz, J. H.; Avorn, J. The Ambiguous Relation Between Aging and Adverse Drug Reactions. Ann. Intern. Med. 1991, 114, 956—966.
16. Taffet, G. E. Age-Related Physiologic Changes. Geriatric Review Syllabus; A Core Curriculum in Geriatric Medicine; Reuben, D. B., Yoshikawa, T. T., Besdine, R. W., Eds.; Kendall/Hunt for the American Geriatric Society; Dubuque, IA, 1996; 11—24.
17. Nahata, M. C. Pediatrics. Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach; DiPiro, J. T., Talbert, R., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G., Posey, M. L., Eds.; Appleton & Lange; Stamford, CT, 1999; 44—51.
18. Gupta, A.; Waldhauser, L. K. Adverse Drug Reactions from Birth to Early Childhood. Pediatr. Clin. North. Am. 1997, 44, 79—92.
19. Piper, D. W.; deCarle, D. J.; Talley, N. J.; Gallagher, N. D.; Wilson, J. S.; Powell, L. W.; Crawford, D.; Gibson, P. R.; Sorrell, T. C.; Kellow, J. E.; Roberts, R. K. Gastrointestinal and Hepatic Diseases. Avery's Drug Treatment; Speight, T., Holford, N., Eds.; ADIS International LTD; Auckland, New Zealand, 1997; 1010—1012.
20. Critchley, J. A.; Chan, T. Y. K.; Cumming, A. D. Renal Diseases. Avery's Drug Treatment; Speight, T., Holford, N., Eds.; ADIS International LTD; Auckland, New Zealand, 1997; 1107—1109.
21. Tillement, J. P.; Lhoste, F.; Giudicelli, J. F. Diseases

- and Drug Protein Binding. *Clin. Pharmacokinet* 1978, 3, 144—154.
22. Smith, J. W.; Seidl, L. G.; Cluff, L. E. Studies on the Epidemiology and Adverse Drug Reactions. *Ann. Intern. Med.* 1966, 65, 629—640.
23. Franse, V.; Stark, N.; Powers, T. Drug-Nutrient Interactions in a Veterans Administration Medical Center Teaching Hospital. *Nutrition in Clinical Practice* 1988, 3 (4), 145—147.
24. Yamreudeewong, W.; Henann, N.; Fazio, A.; Lower, D.; Cassidy, T. Drug-Food Interactions in Clinical Practice. *J. Fam. Pract.* 1995, 40 (4), 376—384.
25. Mason, N.; Boyd, S. Drug-Nutrient Interactions in Renal Failure. *J. Renal Nutrition* 1995, 5 (4), 214—222.
26. Krishnaswamy, K. Drug Metabolism and Pharmacokinetics in Malnutrition. *Clin. Pharmacokinet* 1978, 3, 216—240.
27. Grymonpre, R. E.; Mitenko, P. A.; Sitar, D. S.; Aoki, F. Y.; Montgomery, P. R. Drug-Associated Hospital Admissions in Older Medical Patients. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1988, 36, 1092—1098.
28. Mar, C.; Bent, S. An Evidence-Based Review of the 10 Most Commonly Used Herbs. *West. J. Med.* 1999, 171, 168—171.
29. Fugh-Berman, A. Herb-Drug Interactions. *Lancet* 2000, 355, 134—38.
30. American Society of Health-System Pharmacists. ASHP Guidelines on Adverse Drug Reaction Monitoring and Reporting. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 1995, 52, 417—419.
31. Johnston, P. E.; Morrow, J. D.; Branch, R. Use of a Database Computer Program to Identify Trends in Reporting Adverse Drug Reactions. *Am. J. Hosp. Pharm.* 1990, 47, 1321—1327.
32. Koch, K. E. Use of Standard Screening Procedures to Identify Adverse Drug Reactions. *Am. J. Hosp. Pharm.* 1990, 47, 1314—1320.
33. O'Neil, A. C.; Petersen, L. A.; Cook, E. F.; Bates, D. Q.; Lee, T. H.; Berman, T. A. Physician Reporting Compared With Medical-record Review to Identify Adverse Medical Events. *Ann. Intern. Med.* 1993, 119, 370—376.
34. Prosser, T. R.; Kamysz, P. L. Multidisciplinary Adverse Drug Reaction Surveillance Program. *Am. J. Hosp. Pharm.* 1990, 47, 1334—1339.
35. Porta, M. S.; Hartzema, A. G. The Contribution of Epidemiology to the Study of Drugs. *Drug. Intell. Clin. Pharm.* 1987, 21, 41—47.
36. Strom, B. L., Ed. *Pharmacoepidemiology*, 2nd Ed.; John Wiley: Chichester, 1994.
37. The Detection of New Adverse Drug Reactions; Stephens, M. D. B., Ed.; The MacMillan Press: Basingstoke, 1988.
38. Hanlon, J. T.; Schmader, K.; Lewis, I. Adverse Drug Reactions. *Therapeutics in the Elderly*; Delafuente, J. C., Stewart, R. B., Eds.; Harvey Whitney Books: Cincinnati, 1995; 212—227.
39. Kennedy, D. L.; McGinnis, T. Monitoring Adverse Drug Reactions: The FDA's New MedWatch Program. *Pharmacol. Ther.* 1993, 833—834, 839—842.
40. Kessler, D. A. Introducing MEDWatch: New Approach to Reporting Medication and Device Adverse Effects and Product Problems. *J. A. M. A.* 1993, 269, 2765—2768.
41. *Pharmacoepidemiology: An Introduction*; Hartzema, A. G., Porta, M. S., Tilson, H. H., Eds.; Harvey Whitney Books: Cincinnati, 1991.
42. Guess, H. A.; West, R.; Strand, L. M.; Helston, D.; Lydick, E. G.; Bergman, C. A.; Wolski, K. Fatal Upper Gastrointestinal Hemorrhage or Perforation Among Users and Nonusers of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Saskatchewan, Canada 1983. *J. Clin. Epidemiol.* 1988, 41, 35—45.
43. Meyboom, R. H. B.; Hekster, Y. A.; Antoine, C. G.; Gribnau, F. W. J.; Edward, I. R. Causal or Casual? The Role of Causality Assessment in Pharmacovigilance. *Drug Saf.* 1997, 6, 374—389.
44. Naranjo, C. A.; Busto, U.; Sellers, E. M.; Sandor, P.; Ruiz, I.; Roberts, E. A.; Janecek, E.; Domecq, C.; Greenblatt, D. J. A Method for Estimating the Probability of Adverse Drug Reactions. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1981, 30, 239—245.
45. Karch, F. E.; Lasagna, L. Adverse Drug Reactions: A Critical Review. *JAMA* 1975, 234, 1236—1241.
46. Rawlins, M. D. Adverse Reactions to Drugs. *Br. Med. J.* 1981, 82, 974—976.
47. American Society of Health System Pharmacists. Top-Priority Actions for Preventing Adverse Drug Events in Hospitals: "Recommendations of An Expert Panel." *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 1996, 53, 747—751.

(宋浩亮 译)





药物的安全性评价

Farrel L. Fort

TAP Pharmaceutical Products, Inc., Lake Forest, Illinois, U. S. A.

引言

1. 药物安全性评价的定义和目的

药物安全性评价是指通过动物体内和体外的实验室研究对用于人或动物的治疗剂的药物进行安全性测定。

药物安全性评价对以下情况是必需的：

- 区别新药本身是否有不可接受的毒性；
- 表现出新药潜在的毒性作用；
- 测定不引起非预期副作用的动物剂量及估算用于临床试验的安全剂量；
- 为上市销售证明药物或新的药物制剂的安全性；
- 支持新药通过注册部门的上市批准。

2. 药物安全性评价资料的应用

药物安全性数据被医药工业的科学家和管理部门用来决定新药是否可以被选择进行进一步的开发。药物安全性资料对于一个新药（IND）批准进行临床试验是必需的，也是临床试验开始之前所要求的。进行临床试验的医生参考新药在动物安全性研究中出现的副作用信息作为指南来选择用于临床试验的安全剂量。对于新药的上市申请（NDA），要求进行动物的广泛的毒性学研究。即使新药已投放市场，经过广泛的临床使用后，也可以开展毒理学试验以研究是否有新的副作用。如果上市药品又被开发新的衍生物和新剂型，还要进行毒理试验测定是否新衍生物或新剂型在安全性方面比原来的产品有所改进。

历史的回顾

1. 药物安全性评价的起源

药物安全性评价，像我们今天所知是近年来发展起来的。可能开始于 20 世纪 30 年代末的美国，几个突发事件的结果，促使公众和国会认为需要对医药产品进行安全试验。这些事件引发相关的立法，要求新药上市前必须要进行动物安全性试验。

2. 促进药物安全性评价发展的重大事件

有几个著名的已上市的医药产品毒害了成千上万人的例子^[1]。这些例子使公众、国会和医药联合体的注意力集中在新的医药产品上市前必须先进行安全试验上。

在禁酒的时候，牙买加生姜的乙醇提取物因为其

60%~80%的乙醇含量作为一种违法的饮料很流行。这些提取物通常含有其他成分，包括蓖麻油。一个在纽约市布鲁克林的工厂主试图通过使用替代品三邻甲酚磷酸酯（TOCP）以避免蓖麻油涨价。现在众所周知，TOCP 会引起延迟的轴突性神经病，这种病导致腿的麻痹或运动障碍（即“牙买加姜麻痹”，“牙买加姜汁麻痹”或“姜汁腿麻痹”）。1930~1931 年，大约有 50 000 名美国人受到它的影响。

1937 年，磺胺口服制剂（磺胺酞剂），大约含 72% 二乙烯乙二醇，上市销售。当时，还没有得到磺胺口服制剂的适当辅料，工厂主选择二乙二醇作为辅料，因为在这种辅料中药物显示了很好的溶解性。现在知道，当摄入相当大剂量的二乙烯乙二醇时会引起肾和肝脏的损伤，伴随磺胺酞剂这种副作用会发生。大约 350 人因磺胺酞剂而中毒，105 人死亡。

在 20 世纪 30 年代，二硝基苯酚被用作减肥药。二硝基苯酚在线粒体内通过电子转移解偶联氧化磷酸化，从而刺激代谢能量不受控制地消耗。这引起代谢能量储备，如脂肪的消耗，也导致了体温的升高。在服用超剂量的二硝基苯酚后，一个人至少会因严重的体温升高而死亡。二硝基苯酚也会引起白内障，有几百人因为服用二硝基苯酚作为减肥药而发展成白内障。

反应停事件是众所周知的医疗事故事例，之所以发生这样的事情就是因为是在上市前没有进行足够的试验。反应停从未在美国上市，但是在世界的其他地方使用普遍，作为助眠药和治疗感冒、咳嗽、流感、神经过敏、头痛和哮喘，妊娠期被用作止吐药。最后有报道称，反应停引起多发性神经炎而导致手和拇指的感觉及运动障碍。不管怎样，众所周知的是产生了生育缺陷（如海豹肢和无肢畸形）。在 20 世纪 50 年代末和 60 年代初，有超过 10 000 名婴儿由于他们的母亲在妊娠时服用过反应停而造成畸形。

3. 影响药物安全性评价发展的官方事件

在美国，从 1906 年的食品与药品法案开始，官方认可药物安全性评价作为一门特殊的学科在发展。该条例提供了政府对食品污染物的控制，但没有提供政府对新药安全性的权威保证。

大约在磺胺酞剂事件发生的时候，一项准备成立新的食品与药品法案的参议院议案在众议院被冻结。磺胺酞剂事件的公开促使国会通过了该法案，并且在 1938 年 6 月签署并纳入法律条文中。这个行动创建了食品药品监督管理局（FDA），并要求新药在进入市场前要向 FDA 证明其安全性。



反应停的悲惨事件和公开宣传导致 1962 年 Kefauver-Harris 药物修正案的改版,在美国建立了新药研究-新药申请 (IND/NDA) 制度。这些修正要求新药开始进行临床研究前,必须通知 FDA 进行临床研究的目、临床研究的性质、临床研究者的资格和证明新药安全性的临床前动物安全性的研究结果。这些资料以新药研究申请的形式提交到 FDA。1962 年的修正也要求新药准入市场前提供疗效的证明,该证明通过临床试验而得到,并作为新药申请上市的一部分提交至 FDA^[1,2]。

4. 国际市场对药物安全性评价的影响

国际医药市场对所有的重要医药企业有巨大的经济诱惑力,因此必须开展动物的安全性研究以满足世界范围内管理机构的要求。实际上,这就意味着要满足美国、日本、欧洲经济共同体 (EEC) 和加拿大的要求,因为全世界其他国家没有如此迫切的要求。在某些方面,日本和欧共体的要求比美国的要求更严格。近来,关于协调人用药品注册技术要求 (ICH) 的国际会议已经发表了指南,推荐非临床安全性研究的国际标准。这些 ICH 的指南用于减少地域之间的差别,减少了同一个化合物进行国际性注册的重复工作。然而,如果药物已经在美国被批准上市了,以上未列入的大多数国家则会批准这些药物进入市场。

世界药物安全性研究管理的发展一般都跟随美国管理的发展。这样的管理,1980 年在欧共体颁布,1981 年在加拿大颁布,1984 年在日本颁布。

一般的原则

新药开发过程中,在进行动物安全性研究时要遵循几个一般的原则。这些原则以及背后蕴含的道理有时会被那些不进行药物安全性评价的国家所误解,导致对毒理学研究非正当的批评。

首先,动物毒理学试验的剂量几乎总是高于预期的临床剂量。药物安全性毒理学试验的目标之一是表现出新药的毒副作用。为了表现出药物的毒副作用,足够高的剂量必须被使用,从而使药物的毒副作用得以充分的显现。在前言中提到的第一个目标就是区分药物可被接受的安全性剂量与不可接受的毒性剂量。由这个区分确定的标准是期望的临床剂量,或者是药效活性剂量与动物体内引起毒性的剂量之间的安全范围。要测定这个安全范围,必须使用比临床剂量更高的剂量。另外,为什么动物毒理研究使用高剂量的其他原因是要求表现出实验室动物药理与毒理反应的剂量经常比人引起这些反应的剂量高。

安全范围不是测定一个药用于人是否足够安全的唯一标准。药物引起毒性的类型和预期的临床适应证也是必须考虑的。例如,一个可能致癌的药就不能用于缓解感冒症状,然而,这样的药却可能用于治疗癌症,因为癌症是对

患者本身生命有威胁的疾病。许多抗癌药物就是属于这种类型。换句话说,对于头痛伤风,受益和危险之间的比率太低,但是对于治疗癌症,该比率是足够高的。这是一个非常明显的比较。另一个例子是当今使用的具有致畸作用的抗惊厥药,这些药可以引起胎儿畸形。然而,在妊娠阶段癫痫发作会给胎儿和母亲带来严重危害,妊娠阶段使用抗惊厥药的益处要考虑是否超过引起畸形儿的危险。

在评价药物的安全性时要重点考虑药物毒性作用的可逆性。癌症和胎儿的畸形是不可逆的变化。如果一个药物引起的不是癌症,而是可逆的肝肿大,这样的药物可以被接受,因为它对生命威胁较小。对于妊娠期间使用抗惊厥药来说,新生儿可逆的生长迟缓将是比胎儿畸形更可接受的副作用。

在开发新药阶段,经常研究毒性作用的可逆性以提供决定受益和危险比例的信息。这类信息对临床医生进行临床试验或该药物上市后的使用是有帮助的。对于临床医生,可以帮助他们知道是否特有的副作用出现在试验者或患者身上,在治疗停止后是否消失。动物毒性研究所提供的安全范围不总是绝对可靠的。在临床研究阶段,有必要提高剂量以超出最初临床试验的剂量。在这种情况下,因为剂量被提高,安全范围降低了,副作用更容易出现。如果这些副作用在动物实验中显示出是可逆的,则临床研究者可能对于为了达到预期药理作用所升高的临床剂量更放心了。

动物的毒性研究与临床研究同时进行,或者在临床研究之前进行。新药的研究 (IND) 要求一定量的动物毒性资料,这包括在两种啮齿类动物的急性毒性、致突变性的筛选研究和啮齿类及非啮齿类动物的一个月的毒性研究。临床试验开始后,要开展更多的动物试验,直到申报前为止,这些包括进一步的致突变试验、生殖毒性试验和长期毒性试验,还可能包括致癌试验。

动物试验的治疗期限至少与临床试验的治疗期限一样长,在研发的后期通常比预期适应证的治疗期限更长。这些提供了安全性的另一个要素。对于长期治疗,毒性通常发生在比短期治疗更低的剂量。可能会发现一些药物在机体或某些脏器内蓄积,从而在比短期治疗更低的剂量上出现毒性的改变。偶尔,在长期的治疗中,不同的副作用可以自己显示出来。如果长期的毒性研究在长期的临床试验之前进行,任何在安全范围内的变化或毒性将在开展临床试验前就被了解。为上市而被管理部门所要求的疗程通常比预期的临床疗程要长。

另外一个通常伴随新药安全性评价的原则是应用两种或两种以上的动物进行新药的毒理学研究。通常不可能知道哪些动物能最准确地预测该药在人体上的毒理学反应。然而,如果一种特有的副作用被发现两种或两种以上的动物身上出现,我们可以预测在足够高剂量时这种副作用也会发生在人身上。如果在一种动物上发现产生副作用的剂量比另一种动物的低,则用更敏感的动物去估算对人的安全剂量水平。

Y 药物安全性评价研究的类型

1. 急性毒性

急性毒性试验经常被误解和受到批评因为它使用大量的动物,却得到相对无价值的信息。例如,LD₅₀ (使50%的试验动物死亡的剂量)。值得指出的是,对于这些数据有合理的用处。例如,在发现新药的早期,在没有取得任何种类的毒性数据时,比较LD₅₀与ED₅₀ (供试物产生50%药理作用的剂量)对我们是很有帮助的。这个比较通常用来计算治疗指数(LD₅₀/ED₅₀),治疗指数越高,药理活性和毒性剂量之间隐含的安全范围就越大。这些数字可以快速、低成本地得到,对于一个可接受的新药的进一步发展提供早期的指征。另外,LD₅₀可用于一个药的新批次质量测试。LD₅₀通常用小鼠试验获得,以比较大批药的每个新批次的LD₅₀与同一个药的最初批次获得的LD₅₀;这个快速而廉价的测试方法提供了最后的保证药物与原始药物没有实质上的区别,或者在最后的制剂阶段没有被污染。今天,对于体内试验这些问题还没有好的替代方法。虽然消耗了大量的动物,但这种测试方法快速、价廉,并且可靠。

除了前面提到的急性毒性试验的应用,在新药开发中最初的毒性试验也是必需的。其提供的信息被用于亚急性和亚慢性毒性试验的剂量选择,在该试验的不同试验阶段,每天对动物进行治疗。研究药物合用的急性毒性是检测临床可能发生的潜在的相互作用的一个方便的方法。如果这样的相互作用被检测到,则这种相互作用可以在亚急性和亚慢性毒性试验中进一步地研究。在这些试验中,供试品以单剂量给予动物,然后观察1周或2周内毒性症状的发展。在观察期末存活的动物进行尸体剖检,以观察是否有显著的可见的脏器改变发生,当观察到脏器改变时,通常要进行显微镜检查,以测定改变的性质。如果要测定LD₅₀,通常用概率分析进行计算^[3]。扩展试验的方法和移动平均数方法由于需要较少的动物将被采用^[4,5]。LD₅₀值对于药物的安全性评价或选择亚急性毒性试验的剂量并不是必需的,只是对于测定化合物的最低致死量和表示急性超剂量的毒性表现是必需的。这个信息对于临床医生使用该药是有用的,对于毒性控制中心也是有用的,在该中心关于急性超剂量作用的信息是必须得到的。对于重复给药的剂量选择,亚急性毒性试验的剂量选择,最低毒性剂量的信息也是需要的。

如果化合物具有低的毒性,LD₅₀经常会测不到,有时致死率或毒性不能被测出。在这种情况下,我们采用一个“限度”剂量的概念。例如,对于啮齿类动物给予5g/kg的剂量,狗给予2g/kg作为限度剂量。如果没有死亡或毒性症状发生,则死亡或毒性剂量简单地被认为是大于预定的

限度剂量。有时限度剂量可能通过灌胃给药的体积来进行测定。例如,对于啮齿类动物,50mL/kg是可以一次口服给药或静脉内给药(IV)的最大体积。对于静脉给药的急性毒性,如果药液是缓慢滴注给药,可以给予更高的给药体积。

用于急性毒性试验的动物通常是小鼠、大鼠和狗。上面提及的一批试验通常在雄性小鼠和雌性小鼠身上进行。雌性小鼠一般比雄性小鼠更敏感,但是选择两种性别是合适的。因为试验目的是仅仅比较新批次的药与以前批次的毒性。与前批次同样的药相比,绝对毒性的重要性不如与前一批相比的相对毒性。作为新药的安全性评价,通常在两个性别的小鼠和大鼠身上,通过几种给药途径进行急性毒性试验,包括预期的临床给药途径。这样可以产生关于由于不同的给药途径引起毒性程度或类型差别的最初信息,即口服、静脉给药、皮下给药(SC)与腹腔给药(IP)的比较。通过比较静脉内给药和口服给药的毒性获得吸收程度的最初指标。急性毒性的性别差别可以提醒毒理学家在亚急性/亚慢性试验中预料这种差别。如果性别差异明显,可能要考虑决定是否继续进行这个化合物的开发。因为亚急性和亚慢性试验通常在大鼠和狗身上进行,在这些物种的动物身上产生急性毒性数据是必要的,有助于在试验中选择剂量。在工业界中关于减少急性毒性试验中使用的动物数量的意识日渐增强,这是因为社会指责实验室研究中存在不必要的动物使用和购买现象,及饲养大量动物的经济上的负担。上述的限度试验和计算LD₅₀的方法为减少急性毒性试验中的动物数量,提供了实际的意义。

2. 眼睛和皮肤刺激

如果一个药预期要通过眼睛或皮肤给药,首先的一个要求是测定与接触的组织产生刺激反应的情况。可能不经意接触到眼睛的药物或药物制剂应该也进行眼部刺激测定。例如,一个用在脸部的局部抗菌药物,可能偶然会进入眼部。吸入的麻醉剂也有接触眼睛的可能^①。

3. 肌肉和血管刺激

如果一个药物制剂通过肌肉和血管进行给药,那么就要进行肌肉和血管刺激试验。这些试验在制剂阶段开展,可以作为一个指导。应该在亚急性试验前就进行这些试验,这样实验动物就可以避免疼痛和遭受痛苦^②。

4. 注射疼痛

很明显,通过注射形式给药的药物制剂在进入人体试验前必须测试由注射所引起的疼痛量。然而,实际上,这种测试很少做,除非一个制剂首先在人体上进行测试,并发现在注射部位有疼痛。前面提到的黏膜和血管的刺激试

① 典型的眼和皮肤的刺激方案,参见药物开发中的动物。

② 这些试验的典型方案在本书“动物在药物研发中的作用”一章中描述。



验,如果动物在注射阶段显示出不舒服的症状,有时就可以提示有疼痛指征,但是这通常不是一个制剂所引起的疼痛可靠指标。肌肉和血管刺激试验可以提示潜在的信息。药物制剂所引起的组织损伤,但并不是注射引起的疼痛。

评价注射剂疼痛的模型是大鼠舔脚爪和小鼠划痕模型。在舔脚爪的模型中,药物制剂被注射进入后足掌部,计数大鼠舔脚趾的次数^[6]。同样,小鼠划痕试验制剂注射在小鼠的背部皮下,计数小鼠在注射部位划痕的次数。

大鼠舔脚趾模型的结果显示与临床疼痛的经验和对于某种抗菌素制剂的肌肉刺激具有很好的相关性^[6,7]。然而,因为从广泛的、多种多样的药物制剂所得到的大鼠舔脚爪结果还没有被公布,这些相关性仅能支持一部分引起疼痛的制剂。对于肌肉注射制剂可能会引起疼痛,但是不会引起肌肉损伤。另外,一些静脉注射液注射时会引起疼痛。

5. 亚急性、亚慢性和慢性毒性试验

设计这些试验以说明药物每天重复给药持续2周至1年的药物毒性作用,以及测定短期到长期的重复给药无毒性作用的剂量水平。

该试验通常在大鼠和狗身上进行,除非发现其中的一种动物不合适。这可能是因为不同动物对药物的药理作用的敏感性不同,该特性不希望在人身上表现出来。大鼠或狗对药物的代谢与人在本质上不同。这些动物可能相对于其他种类的动物来说,对该药物的吸收较少,或者药物动力学可能有本质上的差别。这些在药理反应性、药物动力学或代谢方面的差别在进行初期的毒理学试验时几乎全不知道。一个例外的例子是特异性作用于灵长类动物组织结合位点上的单克隆抗体产品,在这个例子中,灵长类动物将作为唯一被选择的动物进行安全性评价试验。一般来说,人蛋白基因工程产品对灵长类的抗原性比其他种类的动物低,但与人比较接近,或者药理反应性在灵长类是与人类相似,而且也只能在非人的灵长类身上进行试验。在大多数例子中,毒理学试验在大鼠和狗身上进行,直至其中一种动物被发现不合适。直到在健康志愿者身上进行了1期临床试验,才会得到可能导致该结果的信息。

在1期临床试验开始之前,一定量的毒理学数据是必需的,通常包括在啮齿类动物和非啮齿类动物身上的一个个月的试验。试验通常以连续的方式进行,利用短期试验的结果设计随后的更长期试验。这样,急性毒性试验的结果被用于设计两周的试验,该试验的结果用来设计1个月的试验,再由此设计3个月的试验,然后是6个月或1年的试验。典型的试验设计包括两周或更长时间检疫和适应实验环境的时间。在这段时间里,一些测量可以开始,如体重、食物及水的消耗量、尿排出量、血清化学指标、血液学、尿液分析、心电图(ECG)和一般动物体格检查及眼部检查,以决定动物是健康的。剩余的动物安排进行驯化,当不适合的动物被剔除后,保证有足够数量的健康动物能开始试验。

在检疫阶段,通常由兽医对动物进行疾病症状的检查。

在一些例子中,尤其是在长期毒性研究的准备阶段,经济风险很大。一些装运来的动物可能被淘汰,采血进行血清检查是否有病毒抗体存在,以及组织检查是否有感染的指征。

在试验进行过程中,所有的动物均被仔细监测是否有外观、行为、体重和食物消耗方面的变化,这些变量通常是毒性最敏感的指标。试验中,对上面提到的其他变量进行周期性的测试。被测定的变量、测定的时间间隔、试验中测定的次数,取决于被开发的药物、试验时间的长短和使用的动物种类。例如,用狗做试验时,进行血清化学、血液学和血药浓度测定的血液样品的采集可以比较频繁,因为相对于啮齿类动物来说,狗有较大的血容量,比较容易得到血液样品。但是,如果对啮齿类动物进行间歇性的血液采集,通常每个组包括额外多的动物数,因为啮齿类动物的血液容量小,而且在收集血液时会遭受损伤,重复采集血液的过程有可能会改变试验动物对药物毒性损伤的反应,这种可能性将随着血液采集的频率、血液采集的方法(例如,尾巴采血、眼眶采血或心脏采血)和试验药物的性质而改变。许多研究者通过设计额外多的动物提供血液样品来避免产生这种混淆作用的可能性。在一项1个月的试验中,血液样品仅仅在适应期和给药结束期进行采集,但是如果对特定的预期变化的时间阶段有兴趣的话,则可能在2周后采集另外的血液和(或)尿液样品。在一项3个月的试验中,样品可能在每个月结束时采集或每6周采集一次。在一项6个月的试验中,样品可能每3个月采集一次。在一项1年的试验中,样品则是每6个月采集一次。如果恢复期包括在试验设计中,血液和(或)尿液样品在恢复期结束时采集。如果恢复期相当长,或者某个功能的恢复时间阶段非常重要,那么样品可能会在恢复期的多个时限进行采集。恢复期是一个时间阶段,在这段时间里,一些试验动物被停止给药,观察给药阶段出现的毒性变化的可逆性。恢复期的长短取决于试验中毒性改变的性质、治疗周期和某种程度上动物的种类。例如,如果由于过大的药理作用而引起的副作用,如中枢神经系统刺激、心律失常或高血压,这些反应在停止用药后迅速逆转,因此只需要短的恢复期。另外,一些改变可能需要较长的时间才能恢复,如睾丸萎缩或肝肿大就需要较长的恢复期。在缺乏这种标准的情况下(即对预期产生的毒性变化的性质不了解时),一般1个月的治疗期则恢复期为2周,3个月或6个月治疗期则恢复期为1个月,一年的治疗期恢复期为3个月。

在狗的试验中,通常进行心电图记录,可是在啮齿类动物中很少做心电图,虽然没有好的理由说明啮齿类动物不需要做心电图。用背部轴下方(DAI)导联系统,对大鼠记录心电图比对狗更容易、更快。另外,已知大鼠的心脏对影响其他种类动物心电图的药理试剂有反应^[8]。因为大鼠的心率比较快,所以评价心电图更困难。但为什么在大鼠的毒性试验中通常不记录心电图?其主要原因是习惯和历史的惯例。

同样,在狗的身上做特殊的检查,如视网膜电流图是相当容易的,不需要像其他动物那样的麻醉或手术准备^[9,10]。在安全性评价中,视网膜电流图已显示日益增长的重要性,因为许多药物影响视网膜的功能,如喹诺酮类抗菌药和伟哥。

在试验结束时,所有的动物在麻醉下处死,检查内部脏器是否有象征病理反应的肉眼可见的变化,称量脏器,把所有组织的标本收集起来进行组织学检查。在某些试验中,特别是长期的试验,每个组的动物可能在试验的不同间隔期被处死,也要收集组织进行组织学检查。例如,在一项6个月的试验中,一些动物可能在治疗3个月后被处死;在一项1年的试验中,一些动物可能在治疗6个月后被处死。同样,动物在恢复期结束时被处死,或者在恢复期的不同间歇处被处死,用于评价与药物相关的组织变化。在大动物试验中(如狗或猴),有时在方案中就写出所有动物的所有组织都进行组织学检查。然而,在啮齿类动物的毒性试验中,因为使用大量的动物,通常在方案中写出在治疗结束时对照组和高剂量组动物的组织首先进行组织学检查,如果发现与药物相关的改变,则下一个比较低的剂量组的动物组织也要进行检查等。通常只对治疗结束时发现有与药物相关改变的组的恢复期动物的组织进行检查。

在毒性试验中,决定无毒性作用的剂量水平并非是容易的;通常,在一个特定的剂量水平上的发现可能来源于药物的药理作用,如低血压和外周血管扩张引起的指征,或者利眠宁的镇静作用。这种改变被认为是由于毒性引起的吗?当然,它们不是药物的副作用,但是,它们是基于药物的药理作用上的预期反应。另外一个例子是,在高剂量时,药物引起肝细胞肥大的同时诱导肝微粒体酶和肾脏肿大。这些改变可能被认为是适当的生理变化。它们应该被认为是因为毒性而引起的吗?一些研究者寻找一个轻微差别的终点以确定未观察到的作用剂量水平的试验结果。用他们的观点来说,所有引用的例子可以与其他发现集中起来,这样清楚地标记出药物诱导的可观察到的作用中毒性的种类。他们寻找一个剂量水平,在这个剂量水平以下,观察不到药物引起的作用。

对于亚急性、亚慢性和慢性试验剂量的选择是一个敏感的事情,需要经验和判断力。通常用三个剂量水平加上一个或多个赋形剂或非治疗作用的对照组。最高剂量的选择要产生某种程度的毒性,该剂量产生的毒性不能使动物在试验结束前就死亡或衰弱,其目的是在重复给药时产生药物的毒性,如果该剂量太高了,动物可能在治疗期结束前就死亡,这样就减少了最后测定血清化学、血液学和组织学等检查的动物数,毒性情况就不能充分地表现出来。另外,如果剂量没有足够高地引起毒性,该试验可能因为研究不充分而被管理部门否决。提供一些被期望的临床剂量或血浆水平的低倍数剂量用于低剂量的选择。在药物毒性较大的情况下,低剂量可能与临床剂量或血浆水平相当,但是通常认为在大鼠或狗身上需要有一个非毒性作用的剂量,分别至少为临床剂量的10倍或6倍,因此通常低剂量

至少是临床剂量的这个倍数。中剂量的选择为高、低剂量之间的对数间距,这是因为生物系统对于绝大多数刺激物的反应是成对数关系的。因此,要最好地说明剂量-反应线性关系,应该以对数的比例给予药物。在试验剂量的选择时,必须记住如果高剂量产生预期的毒性,那么中剂量很可能就是无毒性作用的剂量,因此在为试验选择剂量方案时,应该同样考虑到中剂量与临床剂量的关系。通常要求比较相同剂量在长期试验中的毒性与在短期试验中的毒性,如果这个比较成立,则长期试验中的剂量水平可能与短期试验中是相同的。虽然通常至少考虑三个剂量水平,有时为了满足以上的讨论情况还需要考虑更多的剂量水平。

每组的动物数量取决于试验的时间长度、动物的种类、是否包括恢复期、血液样品或其他特殊的步骤是否包括额外的动物。一般来说,提交到管理部门的啮齿类动物的试验,长至3个月的试验至少每个性别10只动物,长至1年的试验至少每个性别20只动物。至于狗,需要提交给注册部门的试验中需要至少每个性别有4只。对于长期试验最好用更多的动物,因为试验期限越长,因偶发事件或疾病而失去动物的机会就越大。进行试验设计时,应该弥补统计学上失去动物的可能性,所以为了最后的试验评价,需要足够数量的动物。

在试验设计时,给药途径是需要重点考虑的。一般来说,在药物安全性评价试验中给药途径与预定的临床给药途径相同。最普通的给药途径是口服。对于大鼠、狗和猴,药物很容易地通过灌胃给药,狗也可以给予胶囊,胶囊也可以给予猴和大鼠。在这些情况下,胶囊通常附加至专用的灌胃针的末端给大鼠灌胃,胶囊加至灌胃管的终端。将灌胃管插入胃部,胶囊从管的末端排出。在长期(即1年)的啮齿类动物试验中,通常将药物混合在饲料中给药。药物混合在饲料中要保证药物的稳定性和生物可利用,以及药物必须均匀地混合在食物中。在进行饮食给药试验前,所有的要求都要说清楚。当通过饲料给药时,必须调整药物在饲料中的浓度以弥补由动物引起的食物消耗的变化和动物体重的变化。例如,在试验早期前3个月,动物生长最快,食物消耗和体重的增长作用对药物作用的影响很可能最明显,调整药物在饲料中的浓度应该每周进行。3个月以后的试验,当啮齿类动物的生长曲线达到一个小的倾斜度时,该调整可以每月做一次。根据前阶段食物的消耗和体重的增长来调整药物在饲料中的浓度,并分别调整各性别组的浓度。如果是研究静脉给药,应该限制试验可以允许的可行期限和(或)可以提供的动物的数量和组数。如果药物制剂不引起血管刺激,采用尾静脉注射,在大鼠身上进行3个月的试验是可行的。在狗身上,进行任意时间长短的试验都是可能的,但是3个月或6个月的试验通常在可行的限度之内。如果药物必须以缓慢注射,则对于组数和动物数量有限,因为进行这样的试验需要增加设备和技术人员。

6. 致突变性

致突变试验是新药被批准进入市场时所需要的。致突

变试验在药物安全性评价中的作用有时被误解。这些试验的目的并不是替代致癌性生物测定,而是预先指出哪些药物在致癌性生物测定中很可能是阳性及可能在人身上要致癌,并检测对人类可能导致遗传性的生殖突变的化合物。这样的判断需要有致突变性测试的高深知识。在一些试验中,基于阳性或阴性结果的数量,相当一部分不能断然预言。

近来认为许多致癌剂,但不是全部,有引起 DNA 损伤的作用。这样的致癌剂有潜在的引起遗传性的生殖细胞突变的作用。近来,致突变试验被设计为发现 DNA 损伤剂的试验,因此这些试验的阳性结果显示试验化合物致癌性和致生殖细胞突变的可能性。但是,设计的检测 DNA 损伤剂的致突变试验阴性结果并不意味着该化合物不是致癌物。现在我们认识到一些致癌剂并不具有遗传毒性。例如,啮齿类动物肝致癌剂,苯巴比妥和氯苯乙烷(DDT)就没有致突变作用。这些化合物被认为作为促进剂能引起肝癌。已知胆汁酸作为促进剂会引起肝癌。在实验条件下,已知某些特定的化合物作为协同致癌物(仅在与 DNA 损伤剂同时试验时加强致癌的作用)和作为促进剂(在使用 DNA 损伤剂以后再使用会加强致癌的作用)而起作用。这些类型的致癌剂不能通过致突变测试而被发现。目前还没有可靠的短期测试方法发现协同致癌物或促进剂,即无遗传毒性的致癌物的常规测试。

大多数公众认为,关于 4 个一组的体外致突变性试验的结果与在大鼠和小鼠身上进行的致癌性生物测试的结果缺乏高度的一致性^[12]。首先,可得到的用于进行比较的化合物数量不足以达到得到关于系列检测能力的结论所需的样本数。其次,用于进行生物测试与遗传毒性测试比较的被选用的化合物在具有遗传毒性的化合物中被严重加权。这使致突变性测试的专一性估算困难(确切的非致癌物产生阴性的结果的能力)。敏感性(确切的致癌物产生阳性结果的能力)和专一性都用于决定一致性(对于确切的致癌物和非致癌物均产生正常反应的能力)。此外,被选择的化合物包括在啮齿类动物生物测试中致癌的化合物而不是具有遗传毒性的化合物。最后,被选择的 4 种致突变测试对于致突变测试结果与生物测试结果的比较体现了一个人为的限定。实际上,遗传毒理学家没有限定仅试验几种特殊的测试。

正如这一章开始所说的,注册管理部门批准新药要求进行某些致突变试验。ICH(国际人用制剂技术要求协调讨论会)^[13]要求一组 3 种试验:①细菌致突变性;②体外细胞遗传学或体外哺乳动物细胞致突变性测试检测对染色体的损伤能力(例如,小鼠淋巴瘤杀伤性 T 细胞[胸腺嘧啶核苷激酶部位]测试);③使用啮齿类动物造血细胞进行染色体损伤体内试验。对于新化合物的最初筛选,我们推荐细菌致突变性和体外细胞遗传学试验。这是因为在细菌致突变试验中,通常 Ames 试验使用鼠伤寒沙门氏菌,具有快速、便宜和敏感的特性。体外的细胞遗传学试验也应包括,因为细菌试验不能发现作用在真核细胞染色体水平的成分。因此,使用这两个试验,一个试验可以相当快地决

定一个新药是不是强的致突变剂,如果体外试验得到阳性结果,而另外一个试验则可以开展以揭示阳性结果的作用机理和突变反应的效能和特异性。如果药物在某些致突变试验中是阳性,但它的作用是相当低的,则该药物可能仍然可以被开发。在这个例子中,体内的致突变试验可以弥补检测反应的不足。这将有助于降低药物益处/危险的比率。某些药物可能仅在活化的微粒体存在时的体外致突变试验中呈现阳性。如果这种情况出现,体外反应代谢产物的分析可能揭示那些产物与体内的代谢产物的不同,于是体外致突变试验与体内危险评价的相关性可以被确定。我们不应该仅接受体外试验表面值的结果。阳性结果的进一步研究通常应该得到保证。同样,在体外致突变测试中,一些哺乳动物细胞对培养基的渗透性和 pH 的改变很敏感,如中国仓鼠卵巢细胞和 L5178Y 小鼠淋巴瘤细胞的体外细胞遗传学测试。测试中的渗透性不应大于 600mOsm/kg^[14], pH 应该在 6.8~8.0 的范围内^[15]。

有几种进行体内致突变试验的转基因动物模型,最广泛使用的是 Big BlueTM 和 MutaTM 小鼠模型。这些动物的基因中插入有大肠杆菌 E 半乳糖苷酶操纵子。当动物被试验化合物治疗时,细菌 DNA 被用于致突变性试验的靶点。经化合物治疗后,细菌 DNA 从组织移去并进入细菌病毒(噬菌体)质粒。该噬菌体用于感染在琼脂平板上生长的细菌。该细菌增殖形成可以被计数的菌落。因为半乳糖苷酶蛋白催化可以产生颜色反应,所以在细菌菌落形成的颜色反应可以用于评价被治疗小鼠内任何组织靶点 DNA 上的突变的存在或不存在。

具体的致突变性试验的指南和方案可以在 1987 年 Naismith、1980 年 Brusick、1984 年 Kilby 等、1994 年 Mirsalis 等、1993 年 Provost 等和 2000 年 Heddle 等中找到,列于参考书目中。

7. 生殖毒性

生殖毒理学包括从交配到妊娠、生育、断奶整个的生殖过程,有时也包括随后几代的生殖功能。通常,用于这些试验的动物是大鼠和兔,在特殊的情况下也使用其他种类的动物,如小鼠、狗或猴。通常进行一系列的试验,以包括生殖的所有阶段。在每个试验内,使用不治疗的对照组动物和 2~3 个药物治疗组的动物。

为了评价对生殖所有阶段的潜在作用,通常对生殖性质不同的方面进行单独的试验。单独的试验通常设计在每个试验期间有一些重叠,这样可以避免试验程序的分离。生育力试验(历史上称为 I 段试验)通常评价药物对精子产生、卵子产生、成配偶表现、交配、生育、胚胎存活和发育及受精卵在子宫内植入过程的影响。致畸胎(II 段)试验是评价药物对胚胎/胎仔存活和发育的影响。出生前、后(III 段)试验评价药物对妊娠后期、分娩、哺乳和出生后发育的影响。一般来讲,将生殖过程分为几个阶段的原因是:治疗阶段越短,不引起过多毒性可以给予的剂量就越高。通过将生殖过程划分为较短的阶段去代替包含整个



Y

过程的长的阶段,可以给予更高的剂量,使药物在生殖过程中任何一部分的毒性都充分地表现出来。如果药物的作用被发现,生殖过程受药物影响的阶段就可以更容易区分。这样可以使临床使用危险性的评估更容易,如果需要,可帮助毒理学家设计进一步的试验,去探索作用的机理。实际上,有时较小的试验可以以平行的方式进行。较小的试验对于根据特定药物的研发计划对生殖过程的不同部分进行评估,在时间上具有灵活性。

7.1 生育力研究

I 段生育力试验通常在大鼠上进行,有时偶尔也用小鼠。使用啮齿类动物是因为方便饲养大量的动物,容易交配,生殖毒理学家对这些种类的动物具有广泛的经验。在这些试验中,交配前雄性动物通常给药 28~30 天,雌性动物通常给药 14 天。啮齿类动物精子产生周期是 60~80 天,然而通过雄性生殖道的组织学评价检测雄性生殖变化,28~30 天的暴露阶段被认为是足够的。对雌性动物在交配前至少 1 周至 10 天治疗期限也是足够的,在这段时间内雌性动物有充分的时间暴露在稳态血药水平。然后,不同性别的个体动物放在一起进行交配。治疗组的雄性动物与治疗组的雌性动物交配,或者将治疗组的一种性别的动物与另一种性别的未治疗组的动物放在一起。观察雌性动物交配的症状,插入或精子阴道涂片检查,决定交配的完成。一般来说,治疗组的雄性动物与治疗组的雌性动物交配,花费比较少,因为包含的动物数量比较少。但如果发现了与药物有关的作用,有必要重复试验,将治疗组的动物与非治疗组的动物进行交配。雌性动物的药物治疗继续经过交配阶段和中期妊娠。雄性动物的治疗直到可能决定是否药物对生育力有任何影响的阶段,如果发现有影响,则可能要求将雄性动物重新交配以观察对生育力影响是否可逆。或者对雄性动物的生殖道进行组织学评价以确定影响生育力的原因。一直等到妊娠结束进行子宫内检查以提供对子宫内发育影响的另外的评价。生育力的研究可能在 IND 申请之前开始,也可能在申请之后开始,但对于申请 NDA 通常是要求的。对雄性动物生育力的研究应该在男性身上进行大规模的(Ⅲ期)临床试验之前进行。这类试验通常在包括有生育力的妇女的任何临床试验之前进行。但是在美国和欧洲,在雌性动物生育力测验完成之前,被肯定为非妊娠的有生育力的妇女和采取有效避孕措施的妇女都有可能入选 I 期和 II 期(通常为小规模)的临床试验。

7.2 致畸研究

在致畸(Ⅱ段)试验中,在胎仔器官发生阶段的过程中将药物给予妊娠动物,虽然也使用其他种类的动物,如小鼠或猴,但该试验通常在大鼠和兔身上进行。最规范的指南要求致畸试验在两种动物上进行,多数人建议大鼠和兔为最适宜的两种动物,因为这两种动物容易饲养和管理,容易配偶或受精(兔),它们妊娠期短,每窝的数量大(便于进行数据的统计学评价)。妊娠期间的药物治疗阶段可能

会搞错,多数指南推荐小鼠和大鼠为妊娠第 6~15 天,兔为妊娠第 6~18 天,日本的指南推荐大鼠为妊娠第 7~17 天。这些指南假定怀孕的第 1 天[发现阴道栓和(或)阴道内有精子的那一天]被计为妊娠的第 0 天。但经济合作和发展组织(OECD)的指南推荐,如果动物是人工授精或妊娠是通过强迫交配的(兔通常通过这些方法中的一种方法使其妊娠),则治疗的天数比通常的天数增加 1 天。为适应所有这些指南的要求,我们推荐对于啮齿类动物妊娠第 6~17 天给药,对于兔妊娠第 6~19 天给药,额外的给药 1 天或 2 天对试验没有副作用,但将依从世界范围内的指南的要求。

妊娠结束时,处死母动物,在子宫内检查存在的活胎、死胎、吸收胎或退化胎。这时,计数植入部位数和黄体的数目。肉眼检查母体动物的内部脏器以发现可能影响妊娠的任何病理改变。称量动物及检查是否有任何外表的异常。一定数量的幼动物被固定,准备进行内部脏器的检查,剩余部分被固定准备进行骨骼检查。对于兔子,所有的幼动物都进行内部脏器和骨骼的检查。被发现的异常被分为畸形和发育异常。畸形是那些不可逆的变化,这些变化改变身体的一致性,干扰机体的功能或有可能威胁生命,在非治疗组动物中通常不被发现。变异是那些可能会可逆的,对机体的一致性或动物的健康没有影响,与正常动物之间表现出很小差异,在非治疗的动物中偶尔也可被发现。一些变化,如被降低的骨骼骨化或肿大的肾盂(表现为肾盂积水),可能是子宫内生殖被推迟的表现。

选择剂量使一些母体的毒性在试验过程中表现出来,这就保证了致畸作用能充分地体现。当药物应用于临床时,这也是一个实际的应用。如果在药物治疗阶段,一名妊娠妇女出现了毒性反应,则内科医生要减少给予的剂量或停止治疗。如果知道药物剂量高到引起母体毒性时不会引起胎儿的毒性或畸形,则内科医生可以保证胎儿没有受到损害。另外,如果药物在引起母体毒性的剂量之下会引起胎儿的毒性或发育异常,则内科医生不再会采用母体毒性的警报征兆,对于这种药物,在没有母体毒性的情况下胎儿可能会受到损害。很明显,这是一种更危险的情况。所以,成年母亲与发育胎儿的毒性比(或 A/D 的比率)的概念具有实际重要性。生殖毒性研究的结果通常以对母体的无毒性作用剂量和对胎儿或后代的无毒性作用剂量的形式报告。

在兔身上进行的致畸试验的特殊情况值得提一下。兔对于一些抗生素引起的肠道菌群的变化很敏感,通常会导致明显的食物消耗的减少,这也会继发性地导致胎儿的毒性、流产和胎儿畸形。在这种情况下,兔表现了一种对药物特有的敏感性,它可能是致畸研究中的一种不适当的物种。然而,标准的方案可能被修改,母体在妊娠阶段药物治疗仅仅几天(即第 6~13 天和第 14~19 天,或者更短的时间)。用这种方式,药物用足够高的剂量可以避免对母体的过多毒性,而对致畸性来说,可以提供足够的剂量试验。

致畸试验通常是生殖毒性的第一个试验,因为它比生

殖其他阶段的试验花费的时间短且人力、物力消耗少,又因为它评价最终的要点,即致畸性,它对药物的进一步开发有重要的影响。

7.3 围产期和产后的毒性

围产期和产后的试验(有时称为Ⅲ段试验)通常在大鼠上进行。在这项试验中,给怀孕的大鼠给药从妊娠第6天至分娩及哺乳。如果要求的话,在妊娠结束时取一些胎仔进行结构和形态检查以满足对器官形成作用试验的需要(致畸变或Ⅱ阶段)。评价药物对胎仔发生、分娩、哺乳、生长、发育、学习/记忆、情绪,通常还有幼畜生殖功能的影响。评价产后发育的指标,如体重的增加、眼睛睁开的时间、耳郭分离、门牙长出、阴道开启和翻正及惊跳反射的形成。哺乳后保留一些幼动物进行行为学的检查,如学习、记忆和情绪。例如,主动或被动回避试验、穿梭箱子试验和T或M水迷宫试验来评价学习和记忆能力。用活动性测试和开场行为试验来评价情绪。另外,可能保留一些幼动物进行交配以测定生育力和F1代的生殖性能。在这种情况下,试验通常在F1代妊娠结束时终止,但也可能被延长以评价F2代生殖的产后存活情况。合理地进行严格的试验以观察药物对后代发育的影响。

8. 致癌性的生物测试

致癌性的生物测试是在啮齿类动物上进行的长期试验,以评价化合物的致癌能力。这些试验参照最初由美国国立癌症研究所建立的指南进行。但其他的指南,如OECD和FDA的对发展和确定方案也都是有用的。它要求在大鼠和小鼠上进行生物测试,整个时间阶段为被试动物成年整个自然生命期间。依赖于所使用的动物品系,大鼠通常是2年,小鼠通常是18个月至2年。动物在开始研究时必须小于6周龄。使用的动物品系通常是Fisher344或Sprague Danley大鼠和B6C3F1和CD-1小鼠。动物每天给药,通常是口服给药。如果药物在啮齿类动物的饲料中是稳定的,则可以均匀地与饲料混合,一般来说是通过饲料给药,这样可以减少所需要的工作人员。另外,对于药物,通常试验化合物在饲料中的浓度以固定的间距进行调整以保持靶剂量水平,经常检查动物是否存在可触知的肿块。在6个月或1年的时间间隔内采集血液样本进行血液学评价,特别要注意白血病的发生。在试验结束时,处死存活的动物,将它们的组织进行充分的评价以确定是否有肿瘤形成。试验的设计通常包括三个药物治疗组加上一个或多个对照组。动物数量对于药物治疗组来说通常每个性别50只,对于对照组来说每个性别100只。但在试验开始之前的前6周至前8周总是要包含额外的动物(即每个性别组5只),这样如果在试验的早期有动物死亡(这通常会发生),也仍然有足够的试验动物以保持预计的每组动物数,剂量以3个月最大耐受剂量(MTD)的结果为基础选择。3个月最大耐受剂量试验的目的是确定用于生物测试的每种小鼠和大鼠品系的每个性别的MTD。最大耐受剂量被定义为能引起一

定程度毒性的剂量,但与对照组相比不使动物体重增加的减少幅度大于10%;同样,它不引起毒性,除非与肿瘤的反应有关,肿瘤反应将会缩短动物的自然生命期。

目前,已可以得到转基因品系的小鼠。应用转基因小鼠,在治疗6个月内而不是2年就可以测定致癌反应。例如,P531/2(P53敲击小鼠),TG·AC和rasH2小鼠模型。这些动物缺少肿瘤形成抑制基因。应用这些动物模型被证明是基于一个事实,即已知这些同样的基因也包含在许多人类的肿瘤内。于是,导致在这些动物致癌反应增强的机理与对人的致癌作用有关。

对于在进行致癌性生物测定中使用最大耐受剂量至今还有争议。对于最大耐受剂量概念的争论是,通常需要满足最大耐受剂量标准的剂量相对于预期的药物暴露水平来说高得不现实,所以在MTD时出现的致癌反应将不能预言在人身上也会出现同样的反应。因此,我的意见是这个高的剂量对于药物潜在可引起癌症的严格试验是必要的,毕竟我们正在试图用相对少量的纯品系动物来预测具有不同敏感性的异质群体对可能致癌物质的反应。即使在动物大部分的生命期给予治疗,也仍然只有2年的时间,而人潜在地接触某些药物的时间更长。因此,为了了解新药的潜在作用,我们必须推进试验系统。不过有些情况可以作为正当的例外。例如,假如在一个特定的剂量水平药物的代谢改变了(观察到不同的代谢产物或动力学),这样就有可能出现组织用通常方式处置药物的能力增加,在更高的剂量水平也将不能预示致癌反应。很明显,如果一种药没有毒性,就不可能有MTD。如果一种药引起性激素或甲状腺激素水平的改变或靶器官反应性的改变,则高剂量可导致动物继发性肿瘤形成而引起内分泌紊乱;如果在低于一定的临界水平时,这种紊乱不发生或如果在人为治疗剂量它们没有被预期,则在生物测试中剂量高于临界水平的肿瘤的形成将不被预言对人的危险。同样的争议也存在,如果药物刺激器官的细胞分化,如实验动物的肝脏,这样引起细胞分化的刺激将很可能导致啮齿类动物肿瘤的形成。所以,必须应用低于刺激细胞分化的剂量来推断对人的生物测试结果^[16,17]。

ICH的指南除MTD外,还允许其他几个选择最高剂量进行致癌试验的替换方法。最高剂量的选择可能同样基于剂量限定的药效学作用或至少高于人血浆25倍全身血浆暴露水平。如果可靠的药理作用被夸大了,则可能会影响试验中动物的生活力。例如,用于治疗高血压的药物会引起血压过分降低,在这个例子里,过分的药理作用可能会导致动物在致癌作用被评价之前死亡或状况很差。其他药物可能会引起行为改变,如多巴胺激动剂,如果给予过量的这种药,会引起机能亢进和刻板症的行为,就像自身致残的行为,这体现出对动物的一个人道的、伦理治疗的问题。25倍的AUC标准仅在无遗传性迹象的情况下可以被使用。在这样的情况下,即使不产生毒性,允许使用使血浆全身暴露水平,即AUC(曲线下面积)比预期人的最高全身暴露水平高25倍的剂量。这种情况下的AUC,原

Y

药和代谢产物都要考虑,既分别又结合。另外,因为动物和人在血浆蛋白的结合上有区别,血浆暴露必须标准化。在一定条件下,可以使用“限量”剂量的概念。在无遗传毒性迹象的情况下,人的剂量必须 $<500\text{mg/d}$,以及在动物得到的AUC必须大于等于人AUC的10倍。如果这些条件得到满足,致癌试验中的高剂量可以被限制在 $1500\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 。如果给予更高的剂量,吸收饱和意味着在某些点,不能获得进一步全身暴露(血浆水平)的增加。在这种情况下,AUC不再随剂量升高,比此时的剂量稍微高一点的剂量可以作为最高剂量。最大的适宜剂量受到配方量的限制,该剂量能够安全地给予动物而没有损伤[通常通过口服灌胃 $10\sim20\text{mL}/(\text{kg}\cdot\text{d})$],或者与营养物混合(即以5%混合在饲料中)。其他因素,如用辅料饲料或其他有生理特性的化合物制备同种混合物的能力,可能也是限制因素。

生物检测结果的统计学分析有时是引起争论的。当发生早期死亡和这些早期死亡的分布在试验组中不一致时,便出现了问题。这是因为在一些组里很多动物早期死亡,这样一来有肿瘤发生危险的动物的数量减少了。于是,在那些组发现阳性结果的可能性人为地减少了。要解决这个问题,一个普通的方法是将整个试验期划分为小的时间间隔,动物在尸体剖检时发现肿瘤或动物的死亡被认为是由肿瘤引起的,在小的时间间隔内进行组间比较。在时间间隔内比较发生肿瘤大鼠的总数,然后用来决定是否治疗组表现出肿瘤发生率增加^[18~20]。

了解决定一个新药是否需要致瘤性生物检测的情况和标准是很重要的。如果一个药预计要长期使用,如一些抗高血压药物或苯二氮草类安眠药给药的期限可以是几年或剩余者的整个生命期,或者它将广泛地不被限制地使用,生物检测有可能是要求的。如果药物很快地影响生长的组织,如骨髓或肠黏膜,或者已知会影响细胞分化,则可能要求进行生物测试。另外,如果药物是短期的,被限制使用,即仅使用几天、几个星期或几个月,而且剂量不很快地影响生长的组织,则将不要求进行生物检测,除非致突变试验指示该药存在危险。如果在一个或多个致突变试验中取得阳性结果,则要求进行生物检测的可能性就高。如果仅在体外试验中取得阳性的致突变结果,而在体内的试验结果是阴性,则进行生物检测的可能性要比体内检测结果呈阳性的情况低得多。无论如何,我推荐要与法规管理部门进行适当的讨论以决定特定的药物进行试验。目前,在大鼠和小鼠身上进行一套生物检测的试验费用接近于200万美元。所以,所包含的费用保证了整个致突变试验的费用,及与法规管理部门的有意义的接触的费用。

9. 免疫致敏

如果新药被怀疑为致敏物质,则需要进行抗原致敏性试验。这些药物的化学结果与已知的致敏物质相似,或者是高相对分子质量的化合物,如肽类。局部给予的药物,不论化学结构如何,通常都进行皮肤过敏性试验。

皮肤过敏试验,全身主动过敏试验和被动皮肤过敏试验有代表性的方案见本书“动物在药物研发中的作用”一章。在一次典型的凝胶-扩散试验中,试验化合物溶液、卵蛋白(阳性对照)或赋形剂(通常为生理盐水)与完全氟氏佐剂混合。将这些混合物给各个治疗组的动物注射(通常是豚鼠),每周一次,共3周。末次注射后2周进行心脏穿刺收集血液,制备血清(抗血清)。凝胶扩散是在含有台盼蓝的双向免疫扩散(ouchterlony)板上进行。每块板都包含同样的孔模式,即环绕一个直径为6mm的孔的六个5mm的孔组成的圆周。将抗血清放在中心的孔内,试验化合物或阳性对照物或赋形剂放在环绕中心孔的孔内。将板在湿润的 37°C 的培养箱内培养一周,由于抗原(试验化合物或阳性对照物)与抗体(在抗血清内)之间的相互作用,生成沉淀带该沉淀带在肉眼或用分析显微镜是可以见到的^[21,22]。

10. 光毒性

在新药的安全性评价中不经常包括光毒性试验,但如果与有光毒性的化合物具有相似的化学结构或药理类型,则可能要做光毒性试验。一个化合物的紫外吸收光谱的信息可能提醒进行光毒性试验。有时药物进入市场后光毒性的报告提醒进行光毒性的试验,研究以决定该药是否引起光毒性,如果引起光毒性,是什么机理。

光毒性要与光敏作用(或光过敏)区分开来。光毒性是由于药物或药物的代谢产物在皮肤与光相互作用而引起的,通常在紫外线范围,产生活性的分子,在皮肤上引起细胞损伤或死亡。光毒性在阳光下产生是非常普通的,因为皮肤暴露在紫外光线的整个范围内。光毒性反应通常显示对药物的量及强度或光暴露的时间的剂量反应。另外,光敏作用是由于药物或它的代谢产物在皮肤与光的相互作用形成的产物引起的免疫反应而导致的。最初药物与光的暴露可能不导致副反应,但是随后药物和光暴露将对致敏的个体产生过敏反应。本章节描述的模型被限制在对光毒性的评价。对免疫致敏章节中提供的皮肤过敏试验模型的修正,再结合药物暴露于光(即紫外线)可以用作进行光敏性试验。

几种敏感的且方便的模型可以用于光毒性试验^[23,24]。豚鼠、兔和小鼠是最普遍使用的动物。在光暴露前,正常的白化病豚鼠和兔必须剃毛或用脱毛剂除毛。使用无毛小鼠有明显的优点,因为在试验之前不需要除毛。也使用胸腺机能正常的无毛豚鼠。这些动物为光毒性试验提供了方便和敏感的模型^[25]。当用正常动物进行光毒性试验时,发现动物的毛总不能从试验部位完全去除,这妨碍了光暴露程度的改变和皮肤反应的得分结果。另外,耳朵,包含相对小的皮肤区域,对光毒性有敏感性的显示。在某些情况下,耳朵可能是获取动物皮肤反应的仅有部分。对于无毛的动物,有更多的皮肤区域用于对皮肤反应的正确观察。与无毛小鼠相比,无毛豚鼠较大的面积更扩大了优点。用无毛动物进行试验,容易对皮肤进行准确打分,因为不可

避免的动物暴露和非暴露的皮肤区域并列出现（这假定动物处于正常休息的姿势暴露在光中）。在同一个动物比较暴露和非暴露侧皮肤的表现上可以比较容易地看出由光暴露所引起的皮肤表现的轻微改变。

现在也推荐一个应用小鼠尾巴进行的试验以测定光毒性^[26]。在这个试验中，使用相同品系、年龄、性别和体重的小鼠。各组小鼠被暴露于药物和紫外光线下。根据药物的不同，在24~28h后，取下尾巴，测量尾巴的湿重。尾巴湿重的增加说明由于光毒性引起的炎症反应。显然，未治疗组和仅仅是药或光的治疗组都作为对照组。

11. 体外的毒性

随着技术的发展，体外毒性研究正越来越普遍地应用于药物的安全性评价。目前，它们的主要用途是作为一种工具筛选化合物对特定细胞类型的毒性及研究对靶器官毒性的细胞机理。

最普通的测试系统包括在培养基中加入药物的细胞进行培养。通常，通过细胞内酶的释放进行评价，如培养基中乳酸脱氢酶或天冬氨酸转氨酶释放或通过其他的标示物，如放射性标记的氨基酸或核苷前体与参入的大分子结合比率的降低。细胞内活性染料中性红摄取的减少也作为许多细胞的毒性的测定方法。荧光染色也可被应用，如细胞内 Ca^{2+} 浓度、细胞内的pH或线粒体功能的估计。这些测定结果都是对测定细胞毒性有帮助的指标，也可以帮助确定毒性的机理。

使用大鼠肝细胞初期培养进行大环内酯类抗生素的潜在肝毒性的筛选，这是筛选化合物对特定细胞类型毒性的一个例子。对于这一类化合物，肝脏是靶器官。在新的环内酯类药物的开发中，这个体外的培养对识别那些对肝细胞有毒的大环内酯类药物和那些比其他已知的应用及广谱抗生素，如红霉素毒性更大的（大环内酯类）药物是有用的。这些信息连同抗微生物活性的数据和抗菌谱、体内急性毒性、吸收都可以用于选择进一步开发的新药候选者。体外的测试提供了快速、灵敏的方法，每种药只需几毫克的量就可以比较几种化合物。这样的体外系统仅可以预示药物对肝细胞的固有特性，它不能预示体内试验获得的吸收、分布和排泄率的变化影响。用于这种测试的肝细胞具有将药物代谢至一个有限程度的能力。但一旦将药物放入培养基，细胞在培养阶段基本上是暴露于那个药物浓度中，这种在同一个浓度被延长的暴露在体内不可能发生，因此在体外观察到的毒性在体内的情况下不可能被预言。同样的争论发生在其他的细胞系统，如肾小管细胞、心肌细胞和角质形成细胞的培养，但细胞类型，如后两种细胞具有另外的局限性，它们不像肝细胞和肾小管细胞那样代谢药物。如果在这些细胞类型中，药物的代谢产物引起毒性，在体外的测试中则不能被发现，除非在测试中提供药物代谢酶系统。

体外进行的新化合物对靶器官毒性的预筛选可以使随后进行动物毒性试验中毒性的严重程度、动物的遭遇和死亡率

降低到最低程度，因为用这种方法，少量的化合物将被进行动物试验，体外试验将减少用于药物开发的动物数量。

要合理地采用这些试验，首先必须了解研究的药物类型所预期作用的靶器官。这方面的知识可能来自药物的经验和来自一系列新药的初期药理学或毒理学的研究。细胞标本，如大鼠肝细胞也可以被用于药物引起肝细胞毒性机理的研究，除了测定细胞内酶的丢失外，还可以测定细胞内谷胱甘肽、三磷酸腺苷（ATP）、钙或不同代谢途径的酶的量以获得毒性可能的机理。

肝细胞和肾小管细胞的初期培养是通过肝脏和肾脏经胶原酶灌注和分离成为细胞悬液而制备的。最初的大鼠心肌细胞也是类似地使用胰蛋白酶分离细胞而制备的，在这样的培养中，可观察到心肌细胞的节律收缩。这些收缩的变化为毒性测定提供了另一个终点^[27]。L6大鼠骨骼肌或肌细胞被用于筛选化合物潜在的肌肉刺激和损伤活性^[28]。

分子生物学方法的更新的技术正被应用于大量化合物潜在毒性的快速筛选（高通量筛选）。这些方法是利用选择性的基因或与毒性反应相关联的基因表达方式的知识。这些方法通常被认为是基因组学或蛋白质组学。一种方式是将细胞、组织或一个动物暴露于试验化合物中，从有关的细胞或组织中提取RNA或蛋白质。如果RNA被提取了，则互补于这个RNA的DNA（cDNA）对于包含有从几千个不同基因来的DNA的芯片是有用的，可用于测定暴露于药物中的组织的哪一个基因被表达。这是通过标记cDNA来测定的，因为它是与放射活性或荧光分子一起构成的。芯片上放射活性或荧光被发现的部位由基因决定，该基因的表达水平可能比未处理过的组织高也可以低。如果蛋白质被提取了，则蛋白质提取物被用于多方位的凝胶色谱分析，以决定基因表达改变的方式。这些方式相当于前面显示的与其他化合物在体内毒性反应相结合的方式。制药业方面在某些情况下进行了努力，最好是通过测定对特定药物副作用的遗传敏感性来了解毒性反应。在对有关的药物产生副作用的人进行基因表达或遗传多态性的研究时，一旦药物敏感性的遗传性质被了解了，其他的潜在患者则可通过试验去避免那些可能对该药的副作用敏感的人。

有几个体外的模型用于快速测定眼的刺激强度。这些试验使活的动物所受的痛苦过程降低到最小。这些试验包括BCOP（牛角膜浑浊）试验和Eyetex试验^[29,30]。在牛角膜浑浊试验中，从屠宰场得到的牛角膜用试验化合物的溶液在组织培养的条件下进行处理，测定是否有角膜浑浊发生。角膜浑浊被认为是一种严重的眼刺激模型。在Eyetex试验中，一个试验化合物被加入到一种专有的蛋白质溶液中，然后观察该蛋白质溶液是否变得浑浊或是否有沉淀析出。这两项试验都有与体内数据相符合的公正的记录。这些试验对于快速筛选大量的化合物或在动物试验前进行的初步试验都是有用的。预言要引起严重刺激性的化合物则不会在动物身上进行进一步试验。

在体外也发展了体外系统用作筛选工具或致畸性的机理研究。最普遍被引举的例子是肢芽试验^[31]和水螅



(hydra) 试验^[32]。在肢芽试验中, 小鼠胚胎肢芽间质细胞培养, 并暴露与试验化合物中。在正常情况下, 间质细胞分化成软骨细胞。破坏这个分化过程的试剂将被预言为有致畸作用。在水螅试验中, 推荐两个方案。在这两种情况下, 试验化合物对生物体已成熟形式的毒性程度对于试验化合物对生物体未分化形式的毒性程度的比率是用于测定相关致畸程度的终点。在一个方案中, 未分化形式是解离的细胞的混合培养, 在另一个方案中, 它是从已成熟形式解离出来的有消化力的部位。在这两种情况下, 未分化的形式将分化或使其再生成成熟形式, 除非被试验化合物所抑制。这两个系统都还没有在新药的开发中广泛使用。水螅试验可能比较适合筛选环境污染物, 因为该试验经济实惠, 又可以大量进行环境化学物质的筛选。

12. 免疫毒性

免疫毒理学是一个领域, 在这个领域测定一个特定器官系统功能的变化精确方法正在日益应用于新化合物的安全性评价。用于功能测定的试验是以用于免疫学研究的方法和用于体内抗微生物和抗肿瘤疗效的筛选新化合物的方法而来的。

在常规的亚慢性-慢性毒性试验中获得的数个变量都可以作为免疫毒性的指标。其中包括变异的细胞计数、脾脏和胸腺质量、脾细胞构成的组织学评价和胸腺及淋巴结的形态学。但应用于免疫毒性评价的新的更精确的方法更具有专一性, 它们可以指示特定的细胞类型和免疫功能是否受到影响。这些较新的、专一的测试目前在筛选新药的常规基础上还没有被应用。它们选择性地应用于被怀疑为免疫中毒剂特定的药物。这种怀疑可能来自于与以前已知的免疫中毒剂(即抗病毒药或类固醇化合物)有结构相关或来自于常规毒性试验中取得的数据。

环境健康科学国家毒性学研究所推荐使用一个等级方法进行免疫毒性试验^[33]。虽然很多方法已经用大鼠进行过试验, 但通常应用近亲交配的小鼠品系进行这些试验^[34]。第一个等级包括那些上面提及的在亚慢性-慢性毒性试验中常规获得的指标及体液介导、细胞介导和非特异性免疫的特定测试中。在这些特定的测试, 动物给予试验化合物 14 天, 然后它们的外周血淋巴细胞或脾细胞被用于测试。体内药物治疗时间的长短随药物类型和它的药物动力学而改变。体液介导的免疫测试包括斑点形成细胞测试以测定对于 T 细胞依赖性抗原(即羊红细胞)来讲形成 IgM 抗体细胞的数量。在这项测试中, 来自于治疗动物的脾细胞与补体和羊红细胞一起进行培养, 从在非溶解的红细胞背景上的被溶解的羊红细胞区域形成的斑点来计算抗体形成细胞的数量。推荐的细胞介导免疫的测试是与有丝分裂刺激素(刀豆素 A 或植物红细胞凝集素)反应的淋巴细胞母细胞与被混合的白细胞反应。在这些测试中, 淋巴细胞分裂的程度是通过测定致有丝分裂剂或异体淋巴细胞分别刺激后, 进入细胞 DNA 的放射性标记的脱氧胸腺嘧啶核苷的数量。自然杀伤细胞的活性是通过从给药动物得到的脾细胞悬液与具有放射活

性的铬标记靶细胞(如 YAC-1 肿瘤细胞)一起培养来测定的。从游离铬释放进入培养基来测定细胞杀伤活性。

第二个等级包括帮助测定包含在第一个等级反应中的特定细胞类型的试验和设计去评估在第一等级中见到的结果与体内相关性的试验。这些测试包括对脾脏 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞、IgG 体液(介导)免疫、细胞(介导)免疫和非特异免疫数量的测定及宿主抵抗激发模型的使用。B 细胞和 T 细胞的测定是采用细胞特定抗体技术。IgG 体液免疫的测定与上面讨论的 IgM 体液免疫相似, 只是在体外的培养时间更长, 这样可以使 IgG 抗体产生增加。细胞介导免疫可通过相似于以上提及的自然杀伤细胞测试方式的依赖于白介素 II 表达的细胞杀伤活性来评估。非特异免疫可通过计数被治疗动物的外周巨噬细胞数及通过测定这些巨噬细胞吞噬铬标记的具有放射活性的鸡红细胞的能力来进行评估。

宿主抵抗模型提供了直接评估在上述试验中发现的任何变化的功能和临床显著性的方法。因为免疫反应的多因子性和免疫系统众所周知的储备能力, 所以直接的评估是重要的。这些测试由传染源或肿瘤细胞组成, 它们常规杀死 10%~30% 未被药物治疗的动物。激发剂引起死亡率的增加表示免疫反应被抑制。激发剂可以被选作激发体液或细胞介导的免疫系统。

生物技术产品的安全性评价

生物技术产品的安全性评价是一个正在发展的领域, 也是争论的课题。安全性评价已经发展到对每个产品有各自的基础。ICH 和 FDA 已经发展了通过生物或细胞培养系统产生的蛋白质及肽类安全性评价的指南^[35]。通过毒理学家之间关于适当地将用于化学合成药物的毒性试验方案用于几个已经开发或临床应用的生物技术多肽类产品的例子的讨论, 对于每个产品应该提出的几个问题已经达成了一致^[36, 37]。

用于产品生产的细胞培养系统的细胞材料会污染制剂的成品的问题引起了许多讨论。如果一个哺乳动物系统通过插入一个 DNA 载体至细胞 DNA 中而加以改变, 其利害关系将超过通过 DNA 转化对最终产品的污染。对于接受这样被污染产品的患者, 潜在的致癌危险性就增加了。对于这种产品, 测定最终产品或从细胞培养系统中提取 DNA 的转化活性是恰当的。经过充分讨论, 污染 DNA 的目标限度为每个终剂量 10^{-12} g DNA。对于污染 DNA 的测试应该建立对每个生产批次的常规质量控制规程。转化活性的试验(即 C3H/10T1/2 或 Balb/c 3T3 细胞中的细胞转换)应该在最初细胞培养系统建立和在定期的间隔即被完成以保证细胞培养系统基因组的稳定性。另一个可能污染问题的来源是由用于产品生产的生物系统的外来细胞物质产生的最终产品的抗原性, 不管是细菌还是哺乳动物。同样, 对于细菌产品, 必须避免致热细胞组分的系统污染。

对于抗人蛋白质的中和抗体的开发是一个重要问题,



它对试验品系来说是外来的。在应用的每个试验品系中都必须测定中和抗体是否存在。这可以很好地限制哪些品系适合用于安全性的研究，也可以限制任何毒性试验进行的期限。一般来说，中和抗体的滴度可以在开始治疗后 10~14 天就产生。因此，对于一个产生这种抗体的产品，超过 14~16 天期限的毒性试验将是不恰当的。

用于安全性试验的产品在某品系动物的药理学活性方面的知识对于一项正确的毒性研究是必需的。很明显，这应该在前面测定。产品引起的唯一毒性可能是过大的药理作用。通过全身暴露于在正常情况下仅在特定部位存在的少量的蛋白质和（或）通过刺激非靶点受体，过大的药理活性可能会出现。对于后者，如果使用了一个不合适的动物品系，产品的安全性可能被高估。单克隆抗体产品代表了这一个要求的一种特定实例。被选为测试单克隆抗体产品的品系必须提供与人相同组织上的抗体抗原受体。如果被选择的品系有结合抗体至非指定组织的抗原受体，或者如果没有结合抗体的抗原受体，则从那些品系得到的结果将会使人误解，是不合适的。通常，产品的结构越接近天然产物，进行广泛的长期毒性试验的需要就比较低，然而如果生物技术产品与天然产物之间在结构上的区别越大，更多的情况类似于化学合成的药物，则要求做更加广泛的毒性研究。通过转基因动物产生人的抗体，可获得更好的人安全性预测。同样，动物的毒性研究可能使用人蛋白质的动物同源物。另外，它有可能在人类疾病的动物模型上进行研究。在这些情况下，应该说明试验系统的药理反应将与在人组织上的反应相似。

有许多信息可以从活体的生理测定而获得，如血压、心电图、体温和呼吸频率。当由于缺少适当品系的动物和缺少产生中和抗体的可能使试验的数量减少时应该尽可能地几个做的试验中获得更多的信息。在这些情况下，活体的测定显得更重要。当产品很可能含有蛋白质时，可能会引起急性“血清样疾病”型的反应和热原，这时测定血压、体温和呼吸参数特别重要。

对这些类型的产品需要进行局部注射部位的刺激试验，因为它们几乎都是经注射给药的。

如果怀疑致畸变的毒害，则可能要进行致突变性试验。如果一个生物技术产品与天然产物有紧密的关系，则不需要通过进行致突变试验去评价其致突变性，对于这些类型的产品，常规也不需要做致癌试验，除非有产生组织激增（即有生长因子）或免疫抑制的情况。可能进行生殖毒性试验，也可能不进行，这决定于产品的性质和它被指定的用途。如果产品被怀疑有堕胎作用（就像干扰素），则将要求做妊娠的灵长类动物的试验。

在药物安全性评价中代谢和药物动力学数据的使用

有许多因素可以影响一个药的血液和组织水平，于是影响靶器官的暴露^[38,39]。

给药途径的选择影响药物的吸收程度和药物水平的时

间过程。对于静脉注射，推注给药后药物水平可以很快上升和下降，在缓慢滴注过程中药物处于一个稳定的水平。口服给药相比于静脉给药，血液水平的升高和降低更慢。然而，吸收程度可能相同，即 100%。肌肉、腹腔内和皮下给药血液水平上升和下降的速度通常在静脉注射和口服给药之间。如果一个药不溶解或注射后从溶液中沉淀出来，则肌肉、腹腔和皮下给药可能会延长药物从注射部位吸收的时间，直至所有的药物溶解和从注射部位被吸收。

对于口服给药途径，多方面的因素可以影响吸收率和吸收程度，如使用的溶液、混悬液，饮食，选择的赋形剂、颗粒的大小和颗粒的溶解率。如果是溶液和混悬液给药，则很可能溶液剂的药物吸收大于混悬剂的药物吸收；另外，药物血液水平上升和下降的时间过程对于混悬液来说很可能进一步延长。增加混悬剂的浓度，如甲基纤维素，可以引起吸收减慢及不完全。与饮食一起给药，通常吸收率和吸收程度比管饲法给药低。因为啮齿类动物夜间进食，药物耗尽的时间阶段比管饲法给药明显延长。但是，因为分散程度的问题，必须制备同种性质的饲料与药物混合，因为给药是长的时间阶段，从饲料中吸收通常可以达到管饲法给药的 100%。如果一个药计划每天给药几次，如超过 12h 时间，则饲料给药可能提供最适当的方式去模仿预期的人的药物暴露。颗粒大小和颗粒溶解度可以影响药物的吸收率和吸收程度，颗粒越小，颗粒的表面积就越大，因此溶解率和吸收率就越大。毒理学家必须仔细使用不同批号的同一个化合物，因为不同批号间颗粒的大小可能不同，这样的变化可能影响从试验动物得到的药物血液水平，这可能会影响毒性观察。

对许多药物来说，大多数的吸收可能发生在小肠，因为小肠有巨大的表面区域。胃的排空率影响药物进入小肠，因此胃的排空率可能会影响吸收率。正常的胃排空时间在啮齿类动物大约为 10min、兔为 30min、狗为 1.3h，然而这些时间受药物或变量的作用，如随剂量的容积或渗透压而变化。这使胃排空对药物吸收动力学的作用进一步复杂化。

给药剂量在高剂量时，口服吸收的百分率可能会降低，如果通过时间胃肠比完全吸收所需要的时间短的话则可能发生。这就是吸收差的药物和药物具有差的溶解度的例子。

赋形剂的选择在化合物的毒性中可以造成显著的差别。用玉米油代替甲基纤维素来悬浮亲脂性的化合物就是一个例子。玉米油可以比较好地悬浮，可能会溶解更多的药物，但由于它停留在胃肠道，可能也延迟了药物的吸收，也可以得到相反的作用。我经历过一个例子，在这个例子中，药物悬浮在玉米油中所表现的毒性明显大于悬浮在甲基纤维素中。尝试在药物水溶性差的情况下进行静脉注射给药试验，经常需要使用非水溶性溶剂，如乙醇、丙二醇或聚乙烯乙二醇去溶解药物。所有的非水溶性溶剂引起某种程度的毒性，不管是心脏毒性、溶血、肝脏毒性还是肾毒性，这些都可能使药物的毒性评价复杂化。因此，非水溶性的赋形剂必须小心选择，给予的量和浓度必须保持在最小。

静脉注射的速率在测定被观察的毒性中是一个关键性

Y

的因素。静脉注射的快速给药可出现高的血液药物峰浓度,这可能会引起毒性,可以用静脉滴注以比较慢的速率给药,来避免该毒性的发生。在比较静脉注射的毒性研究中,注意注射速率是重要的。在一个制剂一系列试验的设计中,很重要的是应用相同的注射速率。测定一个品系动物的注射容积和注射速率的耐受上限时,该品系动物肾小球滤过速率方面的知识可提供有用的指导。如果知道将用于临床的注射速率,在动物的毒性试验中使用相同的注射速率应该是谨慎的。在药物吸收速度和程度及药物的代谢方面通常有动物品系间的差别,这些品系间的差别对于被观察的毒性有重要作用。不幸的是,在设计最初的毒性试验时,毒理学家一般都没有这方面的信息。如果由于与人比较时这些参数有很大的差别,大鼠和狗被发现是不合适的动物品系,则可能必须在另一品系的动物身上重复毒性研究工作。某些药物在所有被吸收的药物达到全身循环之前,大部分药物可能通过肠黏膜或肝脏代谢成为一种非活性形式,这被称为“首过效应”,因为某些活性药物在首次通过黏膜或肝脏时就被消除,这明显降低了药物的有效吸收或表观吸收。另外,如果给予大量药物(即在毒性试验中的高剂量),超出了首过代谢的能力,药物的血液水平将不对称地高,导致极度的毒性。当设计口服或腹腔内注射的毒性试验时,了解任何首过代谢是重要的。当一种药在腹腔内给药时,大多数药物通过门静脉循环吸收,在到达全身循环前流经肝脏。

当活性药物在胆汁中排泄时,它可能被重吸收。这建立了一个胆汁排泄、重吸收、胆汁排泄和重吸收的循环。通常仅仅小部分药物在胆汁中排泄,仅仅一部分会被重吸收。因此,当治疗终止时,该循环不再无限期地继续。然而,这样的肝肠重复循环可以导致比其他更高的药物水平,并可延长药物血液或组织的表观半衰期,这样的循环可导致血液浓度与时间曲线的改变,这样在单剂量给药的峰浓度后跟着一个由排泄药物被小肠重吸收引起的峰浓度。这个现象可影响血药水平及给予的剂量水平能获得的毒性,在设计毒性试验时应考虑这些问题。

在体重量增加和妊娠情况下,因为血液和组织的容量增加,所以分布容积将增加。半衰期($t_{1/2}$)直接与分布容积(V_d)有关,如下式所示:

$$t_{1/2} = \frac{V_d \times AUC \times 0.693}{D}$$

式中:AUC为血药浓度时间曲线下的面积; D 为剂量。体重量增加,排泄的半衰期也增加。通过重复给药,达到药物在血液或组织中稳态浓度所需要的时间或停止治疗后实际上排泄所有药物所需要的时间粗略地是4~5个半衰期。所以,啮齿类动物在快速生长期体重的增加(在最初的3~5个月和妊娠阶段)将对达到稳态血液和组织药物水平所需的时间和对药物从体内清除所需要的时间有影响。

在整个亚慢性-慢性毒性试验过程中决定是否血液水平的累积时,需要4~5个半衰期达到稳态血液水平的概念有实际的重要性,通常的实践是在试验早期采取血液样本,然后在试验结束时再取血液样本来确定是否血药水平在治疗

结束时比治疗开始时更高。如果在治疗开始时没有足够的时间达到稳态血液水平,则结果可能会错误地引导了累积发生的结论。同样,如果恢复期被包括在试验设计中,有足够的时间使药物从试验动物体内排出和有另外超过药物排泄所需的时间使动物从药物作用中恢复过来,这也是重要的。

排泄器官(即肝和肾)的变化可以对血药水平有显著的作用,由于药物排泄的减少,会引起过高的血药水平并伴随毒性。然而一些药物引起主要在肝脏的代谢酶合成的增加,有时会增加胆汁流动的速率。在这些情况下,可能得到的血药浓度比预期的更低。这可能发生在更高的剂量及发生在刺激代谢机制所必需的一段时间之后。

许多药物被代谢成具有药理和(或)毒理活性的产物,这些代谢产物的药物动力学可能与那些母药有区别,使毒性试验的设计和解释变得复杂。

从动物毒性数据推测到人

安全性评价中不断出现的问题是,关于毒理学在动物身上发现预测的值与那些预期发生在人身上的值的相关性。有两个问题是重要的:发生在实验动物身上的毒性变化将以相同的类型发生在人的身上吗?相应的动物剂量,在什么剂量下毒性变化可能发生在人身上?

已经被认识到几种实验动物品系和人之间吸收、代谢和排泄的过程有区别^[40]。这些区别对于选择适当的动物品系进行各个化合物的研究是有用的。然而通过实验认识到,通常被选择的合适动物,假如毒性改变发生在一个以上的动物品系身上,则可以预言这些毒性变化也会发生于人。预言将发生在人身上的毒性类型与预言在什么剂量下将发生毒性反应相比,前者是一个比较小的问题。

一般来说,在一个基础的单位体重,对化学物质的毒性作用,实验动物不如人类敏感。通常敏感性变化与动物的大小成反比关系,更特定的是,敏感性的变化与体表面积对体重的比成反比关系。哺乳类动物的体表面积粗略地是体重的 $2/3$ 乘幂。体表面积对体重的比率决定正常的体温下的能量。转化为机体的热量以保持体温的能量是从动物的基础代谢过程中得来的。因为小动物体表面积与体重之比比较大,所以动物越小代谢率越高。药物或其他化学物质被代谢和排泄通常随着动物品系的基础代谢率而变化,动物的基础代谢率依次随着体表面积对体重的比而变化。于是,可以与人 1mg/kg 比较的剂量,因体表面积不同经调整后在兔、狗和猴身上可能将是 $3\sim 5\text{mg/kg}$,在啮齿类动物大鼠和小鼠可能是大约 10mg/kg 。这些因素经常用于在动物毒性研究的基础上建立人的安全剂量。例如,啮齿类动物毒性试验取得的无毒性作用剂量可能除以10则被定为人的临床试验的最高剂量。

将致癌试验的结果应用于人,仍然是一个争论的课题。一些问题包括了已经在致癌性生物测试章节提及的。在不现实的高剂量下发现肿瘤的相关性被质疑,因为这是从肿瘤发生-剂量反应曲线外推至低剂量,在该低剂量没有自发



的另外肿瘤被发现。在前面提到的一些情况下,在高剂量时,药物的代谢或药物动力学有清楚的变化,在这个剂量发现的结果推测到更低的暴露水平可能被期望不发生在正常情况下的人。肿瘤发生-剂量反应曲线外推至低剂量的合理性(从理论上说肿瘤的发生应该为零)决定于是否化合物作为具有遗传毒性的启动因子或作为非遗传毒性的促动因子或协同致癌物而起作用。具有遗传毒性的化合物引起启动事件,即 DNA 或染色体损伤,甚至可以导致肿瘤形成。不具有遗传毒性的促动因子或协同致癌物仅仅在结合具有遗传毒性的启动化合物的作用时才可能导致肿瘤形成。在相同的时间应用启动化合物或当启动化合物应用后,促动因子才可以作用。协同致癌物仅仅在与启动因子同时应用时才会起作用。对于大多数具有遗传毒性的化合物从理论上来说如果它到达靶 DNA,一个分子就足够引起启动损伤。对于促动因子和协同致癌物,通常认为一个分子是不够的,有一个阈浓度或剂量,低于该浓度或剂量的促动或协同致癌的作用就不能得到。因此,用外推法至低于阈剂量对于通过促动或协同致癌作用的物质是适合的,但对于具有遗传毒性的启动化合物是不合适的。一个例子是,有一类化合物通过与非 DNA 靶点相互作用间接地引起 DNA 损伤,即拓扑异构酶抑制剂。通过拓扑异构酶的抑制作用,由酶引起的 DNA 链断裂被保持;相反,如果没有药物的作用,断裂将像保持 DNA 的正常过程一样被重新接合。药物与拓扑异构酶的相互作用是依据药效学平衡,所以需要一定的药物浓度去干扰酶的作用。这种药物作用虽然引起 DNA 损伤,但应该说明表现一个阈作用,因为低于临界水平的药物浓度是没有生物作用的^[41]。

将动物对眼、皮肤、肌肉和血管的刺激及注射引起疼痛的数据应用于人是值得讨论的。兔眼是预测眼刺激性的应用最普遍的模型,通常认为对于大多数的刺激物来说,这个模型比人稍微敏感些^[42,43]。同样可以说,兔的皮肤也可以作为人皮肤刺激作用的模型。兔的肌肉刺激性试验与临床上肌肉给药制剂引起的疼痛也有很好的相关性,即使这并不是对于疼痛的试验^[44]。如果一个制剂在兔身上引起肌肉损伤,因为动物品系间肌肉组织的相似性,也可以预期会发生在人。动物的血管刺激试验不是总能预示临床的结果。如果一个制剂在动物上引起明显的血管刺激,则它可能在人身上也引起血管刺激。然而在动物身上一个低的或没有的血管刺激,并不意味着该制剂临床没有刺激。有几个变量影响血管内给药制剂的刺激性质,即药物浓度、张力、pH、除药物外制剂的成分、滴注的速率及在同一部位重复注射的次数。当然,动物和临床试验之间这些变量的任何变化都会影响动物血管刺激试验的可预见性。动物肌肉和血管刺激性试验的结果不能用于预测对人注射的疼痛,因为痛在这些试验中并不是终点。对于通过任何途径注射引起疼痛,可应用的测试模型是前面提及的大鼠舔脚趾试验和小鼠划痕试验,这些试验对于已经试验过与临床有相关性的几个化合物显示有预见性。

除那些上面提到的一般毒性试验外,从生殖毒性试验

得到的数据到人的应用包含特殊的考虑,特别是畸形学研究的真实性。直到在人身上进行了足够的流行病学研究才知道在这个领域动物模型预示毒性的真实可靠性。由于需要经费和时间,这样的流行病学研究很少进行。理想的动物模型将与人类同样地处置药物(即通过吸收、分布、代谢、排泄和母体胎儿分布)及有与人类相同的母体-胎盘-胎儿之间的关系。因为我们得到的动物模型很少代表理想的模型,最好的折中方案是在至少两种或更多的动物品系内进行致畸试验^[45]。如果在两种或更多的动物品系内药物引起胎儿毒性或有致畸性,这将是一个好的臆测,即在人身上该药同样也会有这样的作用。已知在人身上有致畸作用的香豆素抗凝剂一类的化学物质同样也至少在一个品系的实验动物身上有致畸作用^[46]。已知有许多化学物质对动物有致畸作用,但对人却不表现有致畸作用,这可能是因为在人身上时暴露水平比较低或通过制剂有更谨慎的药物暴露的管理。当联合使用两种或更多动物品系时,动物模型有较大的可预见能力。通常用于致畸试验的动物品系中,大鼠和小鼠对于模拟人的反应是最好的。但是使用兔联合大鼠或小鼠能提供比较大的可预见性,因为兔不太可能产生假阳性结果。因为兔对反应停的反应,所以它最初被选为常规致畸试验的第二个非啮齿类动物品系。

最后,必须指出,虽然通常应用动物模型可以预言药物在人的胎儿上的毒性,但不能预言在人身上确切的胎儿毒性类型。如果一种物质在动物身上引起任何类型的胎儿毒性,应该怀疑它对人有潜在的致畸作用或胎儿毒性。丙戊酸就说明了这个观点:它在大鼠和兔身上引起骨骼肌异常,在人身上经过流行病学研究显示会引起发病率低的脊柱裂,一种神经管缺损。因此,在动物模型身上引起的胎儿毒性的类型可能与在人身上所引起的病变不同,但人的胎儿毒性可以从动物试验得到预示。反之,丙戊酸在小鼠和仓鼠身上也会引起神经管缺损。总的来说,用于致畸性筛选的动物模型对于人的胎儿毒性似乎能提供合理的预示,取得阳性结果的动物品系数越多,则药物引起人的胎儿毒性的可能性也就越大。

参考文献

1. Sherman, M. Drug and Cosmetic Industry. 1988, 142 (2), 37—78.
2. McCutcheon, R. S. Toxicology and the Law. Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons, 2nd Ed.; J. Doull, J., Klaassen, C. D., Amdur, M. O., Eds.; MacMillan; New York, 1980; 727—733.
3. Finney, D. J. Probit Analysis. Cambridge University Press; Cambridge, MA, 1971.
4. Brownlee, K. A.; Dodges, J. L.; Rosenblatt, M. J. Am. Statist. Assoc. 1953, 48, 262—277.
5. Thompson, W. R. Bacteriol. Rev. 1947, 11, 115—145.
6. Celozzi, E.; Lotte, J.; Stapley, E. O.; Miller, A. K. J. Pharm. Meth. 1980, 4, 285—289.

7. Comerkeski, C. R.; Williams, P. D.; Bregman, C. L.; Hottendorf, G. H. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1986, 6, 335—338.
8. Detweiler, D. K. The Use of Electrocardiography in Toxicological Studies with Rats. *The Rat Electrocardiogram in Pharmacology and Toxicology*; Budden, R., Detweiler, D. K., Zbinden, G., Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1981; 83—115.
9. Schaeppi, U.; Liverani, F. *Agents Actions* 1977, 7 (3), 347—351.
10. Fort, F. L.; Yamamoto, M.; Ando, T. *The Toxicol.* 1987, 7 (1), 96.
11. Vobig, M. A.; Klotz, T.; Staak, M.; Bartz-Schmidt, K. U.; Engelmann, U.; Walter, P. *Retinal Side-Effects of Sildenafil*. *The Lancet* 1999, 353—375.
12. Tennant, R. W.; Margolin, B. H.; Shelby, M. D.; Seiger, E.; Haseman, J. K.; Spalding, J.; Caspary, W.; Resnick, M.; Staseiwicz, S.; Anderson, B.; Minor, R. *Science* 1987, 236, 933—941.
13. International Conference on Harmonisation Draft Guideline on Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals; Federal Register 1987; 16026—16029.
14. Galloway, S. M.; Deasy, D. A.; Bean, C. L.; Kraynak, A. R.; Armstrong, M. J.; Bradley, M. O. *Mutat. Res.* 1987, 189, 15—25.
15. Cifone, M. A.; Myhr, B.; Eiche, A.; Bloesfoldi, G. *Mutat. Res.* 1987, 189, 39—46.
16. Haseman, J. K. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1985, 5, 66—78.
17. Clayson, D. B. *Mutat. Res.* 1989, 221, 53—67.
18. Peto, R.; Br., J. *Cancer* 1974, 29, 101—105.
19. Peto, R.; Pike, M. C.; Day, N. E.; Gray, R. G.; Lee, P. N.; Parish, S.; Peto, J.; Richards, S.; Wahrendorf, J. *IARC Monograph on Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal*, Suppl. 2; IARC: Lyon, France, 1980.
20. McKnight, B. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1988, 10, 355—364.
21. Arakawa, M.; Hori, T.; Innoue, S.; Kanamura, K. *Jap. Pharmacol. Therap.* 1985, 13 (7), 459—469.
22. Campbell, D. H.; Garvey, J. S.; Cremer, N. E.; Sussdoff, D. H. *Gel Diffusion. Methods in Immunology*, 2nd Ed.; W. A. Benjamin, Inc.: New York, 1970; 250—260.
23. Harber, L. C. J. *Invest. Dermatol.* 1981, 77, 65—70.
24. Sams, W. M. *Arch. Dermatol.* 1966, 94, 773—777.
25. Fort, F. L.; Kotz, R. V. *The Toxicol.* 1988, 8 (1), 129.
26. Ljunggren, B. *Photodermatol* 1984, 1, 96—100.
27. Miletich, D. J.; Albrecht, R. F.; Hoishouser, S. J. *In Vitro Toxicol.* 1987, 1 (2), 77—84.
28. Williams, P. D.; Masters, B. G.; Evans, L. D.; Laska, D. A.; Hottendorf, G. H. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1987, 9, 10—17.
29. Sina, J. F. Validation of the Bovine Corneal Opacity-Permeability Assay as a Predictor of Ocular Irritation Potential. *In Vitro Toxicol.* 1994, 7 (3), 283—290.
30. Sina, J. F.; Galer, D. M.; Sussman, R. G.; Gautheron, P. D.; Sargent, E. V.; Leong, B.; Shah, P. V.; Curren, R. D.; Miller, K. A. Collaborative Evaluation of Seven Alternatives to the Draize Eye Irritation Test Using Pharmaceutical Intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1995, 26, 20—31.
31. Kistler, A. *Arch. Toxicol.* 1987, 60, 403—414.
32. Wilby, O. K.; Newall, R. D.; Tesh, J. M. *Food Chem. Toxicol.* 1986, 24 (6/7), 651—652.
33. Luster, M. I.; Munson, A. E.; Thomas, P. T.; Holsapple, M. P.; Fenters, J. O.; White, K. L.; Dauer, L. D.; Germolec, D. R.; Rosenthal, G. J.; Dean, J. D. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1988, 10, 2—19.
34. Exon, J. H.; Koller, L. D.; Talcott, P. A.; O'Reilly, C. A.; Henninsen, G. M. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1986, 7, 387—397.
35. International Conference on Harmonisation Guidance on Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. Federal Register 1997; 62 222 61515—61519.
36. Graham, C. E. *Preclinical Safety of Biotechnology Products Intended for Human Use*; Alan R. Liss, Inc.: New York, 1987.
37. Fort, F. L. J. *Biomed. Environm. Sci.* 1988, 1 (2), 223—224.
38. Smyth, R. D.; Hottendorf, G. H. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1980, 53, 179—195.
39. Clark, B.; Smith, D. A. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 1984, 12 (4), 343—385.
40. Calabrese, E. J. *Drug Metab. Rev.* 1984, 15 (3), 505—523.
41. Fort, F. L. *Mutagenicity of Quinolone Antibacterials. Drug Safety* 1992, 7 (3), 214—222.
42. Freeberg, F. E.; Nixon, G. A.; Reer, P. J.; Weaver, J. E.; Bruce, R. D.; Griffith, J. F.; Sanders, L. W. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1986, 7, 626—634.
43. Kay, J. H.; Calandra, J. C. J. *Soc. Cosmetic Chem.* 1962, 13, 281—289.
44. Gray, J. E. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1981, 1, 290—292.
45. Schardein, J. L.; Schwetz, B. A.; Kenel, M. F. *Environ. Health Perspect.* 1985, 61, 55—67.
46. Schardein, J. L.; Keller, K. A. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 1989, 19 (3), 251—339.

书 目

Acute Eye Irritation Testing, Recommended Guideline; In-

- teragency Regulatory Liaison Group; Testing Standards and Guidelines Work Group, January 1981.
- Acute Dermal Toxicity Test, Recommended Guideline; Interagency Regulatory Liaison Group; Testing Standards and Guidelines Work Group, January 1981.
- Acute Oral Toxicity Testing in Rodents, Recommended Guideline; Interagency Regulatory Liaison Group; Testing Standards and Guidelines Work Group; January 1981.
- Alder, S.; Zbinden, G. National and International Drug Safety Guidelines; M. T. C. Verlag; Zollikon, Switzerland, 1988.
- Brusick, D. Principles of Genetic Toxicology; Plenum; New York, 1980.
- Brusick, D. J.; Bradley, M. O. *In Vitro Toxicology* 1988/89, 2 (3), 151—236.
- Graham, C. E. Preclinical Safety of Biotechnology Products Intended for Human Use; Alan R. Liss; New York, 1987.
- Grice, H. C. The Selection of Doses in Chronic Toxicity/Carcinogen Studies; Age-Associated (Geriatric) Pathology; Its Impact on Long-Term Toxicity Studies; Current Issues in Toxicology; Springer-Verlag; New York, 1984.
- Grice, H. C. Interpretation and Extrapolation of Chemical and Biological Carcinogenicity Data to Establish Human Safety Standards; The Use of Short-Term Tests for Mutagenicity and Carcinogenicity in Chemical Hazard Evaluation; Current Issues in Toxicology; Springer-Verlag; New York, 1984.
- Hayes, A. W. Principles and Methods of Toxicology, 3rd Ed.; Raven Press; New York, 1994.
- Heddle, J. A.; Dean, S.; Hohmi, T.; Boerrigter, M.; Casciano, D.; Douglas, G. R.; Glickman, B. W.; Gorelick, N. J.; Mirsalis, J. C.; Martus, H. J.; Skopek, T. R.; Thybaud, V.; Tindall, K. R.; Yajima, N. *In Vivo Transgenic Mutation Assays. Environ. Mol. Mutagen.* 2000, 35, 253—258.
- International Conference on Harmonisation; Guideline on Dose Selection for Carcinogenicity Studies on Pharmaceuticals. *Federal Register* 1995, 11278—11280.
- International Conference on Harmonisation; Final Guideline on the Need for Long-Term Rodent Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals. *Federal Register* 1996, 61, 428154—428156.
- International Conference on Harmonisation; Guidance on Dose Selection for Carcinogenicity Studies on Pharmaceuticals; Addendum on a Limit Dose and Related Notes, *Federal Register* 1997, 64259—64261.
- International Conference on Harmonisation; Guidance on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals, *Federal Register* 1988, 63 35, 8983—8986.
- Kesterson, J. W. *Drug Inform. J.* 1982, Jan/June, 22—24.
- Kilbey, B. J.; Legator, M.; Nichols, W.; Ramel, C. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*; Elsevier; 1984.
- Klaassen, C. D. Casarett and Doull's Toxicology, 5th Ed.; McGraw-Hill; New York, 1996.
- MacGregor, J. T.; Farr, S.; Tucker, J. D.; Heddle, J. A.; Tice, R. R.; Turteltaub, K. W. *New Molecular Endpoints and Methods for Routine Toxicity Testing. Fundamen. Appl. Toxicol.* 1995, 26, 156—173.
- Marzulli, F. N.; Maibach, H. I. *Dermatotoxicology*, 5th Ed.; Taylor & Francis; Washington DC, 1983.
- Marzulli, F.; Maguire, H. C. *Food Chem. Toxicol.* 1987, 20, 67—74.
- Mirsalis, J. C.; Monforte, J. A.; Winegar, R. A. *Transgenic Animal Models for Measuring Mutations In Vivo. Crit. Rev. Toxicol.* 1994, 24 (3), 255—280.
- Naismith, R. *Mutat. Res.* 1987, 189 (2), 181—183.
- Nuwaysir, E. F.; Bittner, M.; Trent, J.; Barrett, J.; Afshari, C. A. *Microarrays and Toxicology the Advent of Toxicogenomics. Mol. Carcinogen* 1999, 24, 153—159.
- Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals, Part I; Environmental Health Criteria No. 6, World Health Organization; Geneva, 1978.
- Provost, G. S.; Kretz, P. L.; Hamner, R. T.; Matthews, C. D.; Rogers, B. J.; Lundberg, K. S.; Dyaico, M. J.; Short, J. M. *Transgenic Systems for In Vivo Mutation Analysis. Mut. Res.* 1993, 288, 133—149.
- Purchase, I. F. H.; Hard, G. C. *Toxicology In Vitro* 1987, 1 (1), 3—57.
- Schardein, J. L. *Drugs as Teratogens*; CRC Press; Cleveland, 1976.
- Schardein, J. L. *Chemically Induced Birth Defects*, 3rd Ed.; Marcel Dekker, Inc.; 2000.
- Sontag, J. M.; Page, N. P.; Safflotti, U. *Guidelines for Carcinogen Bioassay in Small Rodents*, National Cancer Institute Carcinogenesis, Technical Report Series No. 1; Publication No. (NIH) 76—801; DHEW, February, 1976.
- Taylor, P. *Practical Teratology*; Academic Press; New York, 1986.
- Teratogenicity Studies in the Rat, Mouse, Hamster, or Rabbit; Recommended Guideline; Interagency Regulatory Liaison Group; Testing Standards and Guidelines Work Group, January 1981.
- Wilson, J. G. *Environment and Birth Defects*; Academic Press; New York, 1973.

(杜敏琼 宋浩亮 译)

Y

药物的蛋白结合

Sylvie Laganère

Origenix Technologies, Inc., Quebec, Canada

Iain J. McGilveray

McGilveray Pharmacon, Inc., Ottawa, Ontario, Canada

引言

药物静脉给药或血管外给药吸收入体循环后,药物能够分布在血液的组分中(红细胞等)或与血浆蛋白结合。血液将药物输送至不同的器官,药物在各器官以不同的速率扩散。没有与血浆蛋白结合的药物在血管外的腔室和组织中扩散,并有可能进一步与其他蛋白或组织结合。

游离药物的浓度与所期望的或不期望的药物(毒理)药理作用更密切相关,因为只有游离药物才能到达组织受体^[1~3]。然而,治疗药物监测(TDM)往往通过测定血浆或全血中总药物浓度(结合的与未结合的)来警示无效或毒性水平,以便在需要时调整剂量。简单抽血后测定总体药物浓度是较容易的,通常情况下游离药物浓度和整体药物浓度的比例是恒定的。本章论述药物蛋白结合的各方面内容。

药物蛋白结合率测定方法

测定药物与血浆蛋白结合最常用的方法有平衡透析法(ED)、超滤法和微透析法。这些方法各有优缺点,测定结果有方法和条件的特异性。

除了测定药物与血浆蛋白的结合程度,还可以测定结合位点的数量、亲和常数和相关蛋白的性质^[4],这些数据可以用来解释结合对药动力学和药效的影响。研究过程中需要从吸附于蛋白质的结合物中分离游离配基,通常是药物小分子。

1. 平衡透析法

1943年提出的平衡透析法至今仍是最常用的方法^[5,6]。用半透膜分隔成两室,一侧是含有蛋白和结合配基的血浆或血清,另一侧则是游离药物与缓冲液。游离分数由缓冲液一侧的药物浓度 $[D]$ 除以血浆一侧的药物浓度 $[D] + [DP]$ 计算得到。其结果受药物性质、蛋白质(组成和浓度)、室体积、缓冲强度、离子的组,以及膜的厚度和理化性质的影响^[4]。时间和温度是主要的环境因素,对于酸性和碱性药物,37℃透析不到4h最理想^[6]。

平衡透析法通常选择天然纤维素膜^[7]。天然纤维素膜对酸性或亲水的药物吸附低。在研究亲脂的药物或碱性药物时必须考察其非特异性吸附^[4]。

在实验中,血浆和缓冲液间因渗透压梯度造成的稀释和体积变化需要加以考虑和校正^[8]。而水溶性差的药物很难研究,因为有机溶剂会影响分配平衡,且这类药物也可能聚集或黏附在膜的表面^[7]。

2. 超滤法

尽管超滤法与平衡透析法同时提出^[9],但其常规应用直到最近才成为可能,主要是因为膜和装置的发展。从溶液中分离蛋白和结合配基采用合适的膜,该膜能截留蛋白,并通过正压或离心辅助其截留。

超滤法的主要优势是速度(少至15min),这对于临床药物监测^[6]和不稳定的药物是很重要的指标。与平衡透析法一样,膜的性质和体积相当重要。膜是渗透选择性的(如Amicon[®]),截留取决于蛋白相对分子质量,如分离白蛋白与球蛋白(如 α 酸性糖蛋白, AAG)。然而在一些情况下,也能截留高分子的药物^[7]。低浓度药物特别是脂溶性药物在膜上的吸附是要解决的问题,用药物饱和或硅化吸附位点可以解决此问题。

理论上,游离配基在超滤液和截留物中是恒定的^[10]。但是,截留物中游离药物浓度的减少会导致结合药物的解离。若超滤液的体积不超过原体积的40%,游离配基的浓度将不受影响^[11]。平衡透析法和超滤法对于低浓度或结合率大于90%的药物存在缺陷,都需要放射同位素才能达到足够的定量灵敏度。

3. 微透析法

微透析法灌注被看作是传统研究蛋白药物相互作用技术的一种替代方法。样品中的小分子物质,如药物扩散进入纤维,转移至收集瓶而分析测定。透析膜排阻大分子物质,如蛋白及与蛋白结合的药物。微透析法可以用标准的技术分析,其灌注能达到超滤法相同的速度,而且从结合药物中分离游离药物不会出现再平衡过程。

因为这项技术需要色谱法进行分析,所以分析时间较超滤法长,它也同样适合测定体内药物蛋白结合,这是因为微透析的探针器可以植入静脉内。在服药后的生理环境中,可以在体测定药物结合率^[12]。我们已有一些验证将此项技术用于测定体血浆中未结合药物分数。虽然苯妥英和外消旋氨鲁米特平衡透析法和微透析法测定结果具有良好的一致性,但是微透析法测定咪唑米和丙吡胺等的未结合分数显著偏高^[13]。用上述两种方法测定醋丁洛尔、对乙酰

氨基酚、头孢噻吩、氯霉素、异烟肼、苯妥英、水杨酸、茶碱、华法林的结果具有良好的相关性^[14]。由于理化性质和分析限制,微透析法似乎并不适用所有的药物^[15,16]。

Pacifici 和 Viani^[6]评价了各种研究蛋白结合方法的测定结果比较,指出这些方法需要标准化。目前,结论很大程度上取决于所采用的技术及对结果的解释,然而一些试验细节如采用的抗凝剂、透析或过滤膜的类型、缓冲液的性质、透析的时间和温度,都是需要考虑的因素。

蛋白结合参数

药物结合各种蛋白,例如血浆中的白蛋白、球蛋白(如 α_1 -酸性糖蛋白 AAG 和传递蛋白)、脂蛋白和组织蛋白。药物与大分子如蛋白的可逆结合是一个平衡过程,这种关系可用质量作用定律来描述。



式中: $[D]$ 、 $[P]$ 和 $[DP]$ 分别指游离药物、未被占据的蛋白和药物蛋白复合物的摩尔浓度; k_1 、 k_2 指反应的速率常数。

反应的平衡结合常数 K_A 定义为 k_1/k_2 , 作为结合位点与配基亲和性的指数。 K_A 的倒数可作为药物蛋白复合物的解离常数 K_D 。

$$K_A = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[DP]}{[D] \cdot [P]} \quad (2)$$

平衡时,未结合药物分数(f_u)可通过下面的关系式计算:

$$f_u = \frac{[D]}{[D] + [DP]} \quad (3)$$

一种蛋白可能有数个独立的结合位点,这些位点能表现出相同或不同的药物亲和性。一个位点的结合不影响其他位点。容量常数 N_{TOT} 指每摩尔蛋白的结合位点数乘以蛋白质摩尔浓度的位数,单位为位点/升。

结合药物浓度可以表示如下:

$$[DP] = \sum_{i=1}^{n=i} \frac{N_{TOT,i} [D]}{K_{D,i} + [D]} \quad (4)$$

式中: i 为结合位点种类的数目; $N_{TOT,i}$ 为结合容量常数; $[D]$ 为未结合药物浓度; $K_{D,i}$ 为 i 位点解离常数。因此药物的结合程度取决于药物的亲和能力、1mol 的结合位点数及药物和结合蛋白的浓度。

图 1 为单一结合位点 $[DP]$ 和 $[D]$ 关系图。随着未结合药物浓度增加,结合位点浓度增加。当 $[D]$ 远大于 K_D 时,方程预测 $[DP]$ 达最大值,与最大位点数 N_{TOT} 相当。解离常数 K_D 代表一半结合位点被占据的未结合药物的浓度, $[DP] = N_{TOT}/2$ 。式(3)经线性转换后,如 Scatchard 图、Woolf 图和双倒数图可用来确定解离和容量常数。只有一种结合位点时,关系是线性的。有两种结合位点时,或与一种以上的蛋白结合的关系是曲线的^[17]。如 Scatchard 方程描述一种结合位点时:

$$\frac{[DP]/P_T}{[D]} = N \cdot K_A - \{K_A \cdot [DP]/P_T\} \quad (5)$$

式中: P_T 指蛋白质总摩尔浓度(结合+未结合); N 指单位摩尔蛋白质所具有的结合位点数。 $([DP]/P_T)/[D]$ 对 $[DP]/P_T$ 关系可得出线性斜率 K_A 和 y 轴截距 NK_A 。运用非线性最小二乘法计算机程序如 PCNONLIN 可更精确地推算出容量和亲和常数^[18]。

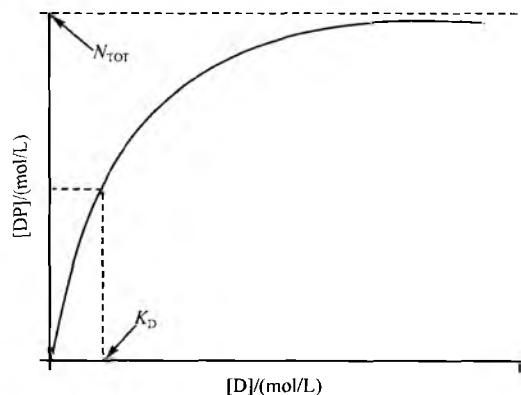


图 1 一种结合位点时结合药物 $[DP]$ 与未结合药物浓度 $[D]$ 的关系图

得到容量和亲和常数后,对于只以单一结合位点结合的药物任意浓度,其游离分数可以通过计算得出:

$$f_u = \frac{[D]}{[D] + [DP]} = \frac{K_D + [D]}{N_{TOT} + [D] + K_D} \quad (6)$$

当药物与两种结合位点结合(如白蛋白和 AAG)时,方程式如下:

$$f_u = \frac{1}{1 + \frac{N_{TOT1}}{K_{D1} + [D]} + \frac{N_{TOT2}}{K_{D2} + [D]}} \quad (7)$$

这些方程式显示未结合的药物分数取决于结合容量 N_{TOT} 、解离常数 K_D 和平衡时未结合的药物浓度。当游离药物浓度较低时,如 $[D] \ll K_D$, 游离分数与药物浓度无关。

药物结合蛋白

人血浆中含有 60 多种蛋白质^[19],与药物结合相关的三种主要蛋白是白蛋白、AAG 和脂蛋白。本文对最近研究的药物转运蛋白如 p -糖蛋白、有机阴离子转运体和二肽转运体不作赘述^[20]。

1. 白蛋白

白蛋白(M_w 为 66 300)也是一种重要的结合蛋白,存在于血浆(40%)和小肠液(60%)中^[21],能与大多数酸性(带负电荷)药物结合^[22],也能与带正电荷的药物结合,占总血浆的 60%^[23]。这种水溶性蛋白等电点约为 pH5。因此在生理条件下,它带负电荷,酸性药物通常与 N -末端结合,它在正常血浆中的浓度为 38~48g/L。白蛋

白在肝脏合成中,半衰期约为19天^[23]。

已发现人白蛋白有两个主要的药物高亲和位点:结合位点I,起初发现与华法林结合,后来发现它也与其他药物如磺胺类药物、苯妥英、丙戊酸和保泰松发生结合;结合位点II(苯并二氮结合位点)结合半合成青霉素和丙磺舒。蔡普生、吲哚美辛和甲苯磺丁脲与这两种位点都能结合。

2. AAG

AAG(血清黏蛋白)在肝内合成和代谢,半衰期约5.5天^[22],是一种 α_1 -球蛋白,相对分子质量 M_w 为40 000,比白蛋白小。它是一种急性期反应物,在压力包括疾病条件下浓度增高。有报道在血浆中至少有4种多形态和4种基因变体^[25,26]。

许多碱性药物(阴离子)如普萘洛尔、利多卡因和中性药物显著结合于AAG,通常浓度为0.07~1.1g/L,或结合于脂蛋白和(或)白蛋白^[27]。通常情况下,同时与AAG和白蛋白结合的药物与后者亲和力较高,因为AAG血浆浓度比白蛋白浓度低,AAG被认为是低容量高亲和力的蛋白。AAG也结合一些酸性^[28,29]和中性药物如卡马西平^[17]、泼尼松龙^[30]。一些血浆中的药物游离分数的患者间差异与AAG血浆浓度有关,如普萘洛尔^[31]、卡马西平^[32]、丙吡胺^[33]、阿普洛尔^[34]、丙米嗪^[34]、利多卡因^[35]和美沙酮^[36]。

3. 脂蛋白

脂蛋白是一类不同蛋白的统称(对于 β -脂蛋白,相对分子质量 M_w 为2 500 000)。脂蛋白可分为四类:乳糜微粒(CM)、极低密度脂蛋白(VLDL)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)^[37,38]。普罗布考与脂蛋白的结合占其血浆结合的95%^[37]。中性和碱性亲脂药物多数结合脂蛋白,而一些酸性药物与脂蛋白结合率较低^[37]。与脂蛋白结合的药物包括普罗布考、环孢素、普萘洛尔、利多卡因、吲哚洛尔、地高辛、洋地黄毒苷和四环素^[37,39~41]。奎尼丁和一些抗抑郁药物如阿米替林和去甲替林与脂蛋白结合时出现饱和现象。对于阿米替林、丙咪嗪、去甲替林和环孢素,有报道游离药物分数与各种脂蛋白浓度关系成负相关^[37,39,42]。

治疗剂量下一些与各种血浆蛋白高度结合(>70%)的酸性、碱性和中性药物见表1^[43]。

表1 药物与血浆蛋白结合(>70%)的主要蛋白^[43]

白蛋白 (%结合)	白蛋白和 AAG (%结合)	白蛋白和脂 蛋白 (%结合)	白蛋白、AAG 和 脂蛋白 (%结合)
头孢曲松 (A)	阿普洛尔 (B)	环孢素 (N) ¹⁾	阿米替林 (B)
克林霉素 (A)	卡马西平 (N)	普罗布考 (N) ¹⁾	布比卡因 (B)
氯贝丁酯 (A)	丙吡胺 (B)		氯丙嗪 (B)
地塞米松 (N)	红霉素 (B)		地尔硫草 (B)
地西洋 (B)	利多卡因 (B)		丙咪嗪 (B)

续表

白蛋白 (%结合)	白蛋白和 AAG (%结合)	白蛋白和脂 蛋白 (%结合)	白蛋白、AAG 和 脂蛋白 (%结合)
二氮噻 (A)	哌替啶 (B)		去甲替林 (B)
双氯西林 (N)	美沙酮 (B)		培拉嗪 (B)
地高辛 (N)	维拉帕米 (B)		普萘洛尔 (B)
依托泊苷 (N)			奎尼丁 (B)
布洛芬 (A)			
吲哚美辛 (A)			
萘夫西林 (A)			
蔡普生 (A)			
苯唑西林 (A)			
保泰松 (A)			
苯妥英 (A)			
丙磺舒 (A)			
水杨酸 (A)			
磺胺异噻唑 (A)			
替尼泊苷 (N)			
硫喷妥钠 (A)			
甲苯磺丁脲 (A)			
丙戊酸 (A)			
华法林 (A)			

1) 白蛋白是较少的蛋白; A: 酸; B: 碱; N: 中性。

结合对药物处置的影响

1. 分布容积

稳态表观分布容积(V_{ss})受到血浆和组织蛋白结合的影响。其关系遵循式(8):

$$V_{ss} = V_p + (f_p/f_T)V_T \quad (8)$$

式中: f_p 和 f_T 指血浆和组织中游离药物分数; V_p 和 V_T 分别指药物在血浆和组织中的分布容积^[44]。血浆与组织结合的重要性在于它是表现分布容积的首要决定因素。身体各组织内药物分布平衡各不相同。

组织结合

组织结合可能成为药动学性质,包括分布容积、半衰期的主要决定因素。目前尚没有完全满意的组织结合测定方法。采样是侵入性的,难以验证实验动物与人体的重要性^[45]。

组织中奎尼丁对地高辛的取代^[46]和尿毒症患者对地高辛组织结合下降^[47]是组织结合变化的另一个例证。在上述两种情况下,地高辛的分布容积下降。

药物与组织的结合通常是可逆的。然而在一些情况下

是共价结合,是不可逆的。这一点对药物或代谢物是重要的,它可能与毒性有关^[48]。有报道表明动物试验中对乙酰氨基酚、异烟肼、多柔比星、咪唑米与肝蛋白共价结合的程度与肝局部坏死严重性呈良好相关性^[48]。

分布容积大的药物具有的性质包括与血浆蛋白结合弱,而与组织蛋白有高亲和性和高脂溶性。分布容积增加可能与血浆游离药物分数相关,如普萘洛尔在慢性稳定肝脏疾病中的情况^[47]。此外分布容积增加也可能是与白蛋白结合的药物从血管向肠道转移,如报道的头孢曲松在开胸手术中的情况^[49]。AAG 结合的药物分布容积减少可能与血浆中结合增加有关,在压力相关状况下,血浆中 AAG 含量增加。当组织和血浆中游离药物浓度一致时,分布达平衡。

2. 消除

2.1 肝清除

由 Rowland^[50] 和 Wilkinson^[51] 提出了器官消除的简单静脉平衡模型,可用来预测蛋白结合对肝血浆清除的影响:

$$Cl_H = \frac{Q(Cl_{L,u}f_u)}{Q + (Cl_{L,u}f_u)} \quad (9)$$

式中: $Cl_{L,u}$ 是肝对未结合药物的固有消除率; Q 指肝血浆流量; Cl_H 指肝清除率。

另有一些描述肝脏清除的模型包括正弦曲线模型和分布模型^[52],这些模型都假定只有未结合的药物能自由透过细胞膜,而且肝中参与代谢的药物分数与体循环中测定的未结合的药物分数相同。 $Cl_{L,u}$ 值由整体药物固有清除率除以未结合药物分数测定值而得到。

当参与代谢的药物分数不限于未结合药物分数时,有证据表明肝清除也不限^[53]。与 AGG 或脂蛋白结合的药物可以通过肝实质细胞吞噬作用直接摄取^[54,55]。

2.2 药物限制性清除

如果一个药物在某个消除器官的提取效率 (E) 不大于静脉循环中游离药物分数,那么其清除被称为是限制性的。这样的药物只有未结合的部分才参与在组织中的分布、生物转化和消除。对于低提取率 ($Cl_{L,u}f_u < Q$) 的限制性消除药物,游离分数的变化影响血液清除,式 (9) 简化为式 (10):

$$Cl_H = Cl_{L,u} \cdot f_u \quad (10)$$

对于限制性消除而且提取率低的药物,其平均稳态血药浓度可通过下列方程测定:

$$C_u = \frac{FD/\tau}{Cl_{L,u}} \quad (11)$$

式中: τ 为给药间隔。因此,未结合药物分数不影响未结合药物浓度,此时药物与蛋白结合变化时不需要改变给药剂量。

需要指出的是,由药物相互作用导致的 f_u 值 (血浆中游离药物分数) 增加,会带来短暂的游离药物浓度的增高,而当达到稳态时又恢复到原来的水平^[56,57]。

血浆或组织结合的变化对消除半衰期的影响取决于结合对分布容积和消除的相对作用。对于限制性消除、低提取率而且分布容积中等或大的药物 ($>0.4L/kg$), 半衰期可用式 (12) 表述:

$$t_{1/2} = 0.693(V_T/Cl_{L,u} \cdot f_T) \quad (12)$$

血浆结合的变化对其半衰期影响较小 (如地西洋、苯妥英)^[56]。分布容积小的药物 ($<0.4L/kg$) 如华法林, $t_{1/2}$ 受血浆或组织结合变化影响较大。

药物明显的相互作用主要表现在蛋白结合的取代,如水杨酸取代苯妥英和三氯乙酸替代华法林,三氯乙酸为水合氯醛的代谢产物^[57]。如上所述从蛋白上取代限制性消除的药物会减少总的药物浓度,但在稳态下不影响平均游离药物浓度,因此不需要调节苯妥英的给药方案。有必要临时调整华法林的给药方案,因为这个药治疗窗窄,半衰期长而且分布容积小。

2.3 肾清除

肾内只有未被结合的药物才能被滤过。如果其药未被结合而且没有发生分泌和重吸收那么其肾清除率就是肾小球滤过率 (GFR)。如果药物与蛋白结合,药物总的肾清除率小于 GFR,但游离药物清除率等于 GFR,这种关系可用下面的等式描述: $Cl_R = f_u \cdot GRF$ 。对于既吸收又分泌的药物,改变蛋白结合的影响是较难预测的。肾清除率可用式 (13) 表示:

$$Cl_R = (Cl_{RF} + Cl_{RS})(1 - FR) \quad (13)$$

式中: Cl_{RF} 指肾滤过率; Cl_{RS} 指肾分泌率; FR 指重吸收分数,并且

$$Cl_{RS} = RBFf_u Cl_i / (RBF + f_u Cl_i) \quad (14)$$

式中: RBF 指肾血流量,由小管分泌的药物 (如青霉素) 与血浆蛋白结合无关。头孢曲松和丙磺舒的相互作用而产生的副反应未见报道,也许可以用头孢曲松治疗窗宽解释^[58]。

2.4 非限制性消除药物

器官清除率高 ($Cl_i > Q$) 的非限制性消除 ($E > f_u$) 药物的清除率主要取决于器官血流量,因此游离部分不是限速因素,游离部分的变化不会影响血液清除率。例如口服制剂的生物利用度不受血液或血浆蛋白结合率的影响。非限制性消除的药物无论是口服还是静脉给药,血浆蛋白发生变化都不会影响平均血药浓度^[56]。吗啡、哌替啶、利多卡因、维拉帕米^[59] 和三环类抗抑郁药^[61] 是非限制性消除药物。

肾小管分泌清除的非限制性药物包括青霉素和乙酰唑胺^[57]。由于阿司匹林和磺胺类药物的取代,青霉素的游离分数显著上升,达到了 88%,而血药浓度没有发生变化。由于这些治疗窗宽,所以这种相互作用对临床的影响并不重要^[62]。虽然结合改变不会影响到清除率, f_u 值变化可能影响药效。非限制性消除药物的消除半衰期可用式 (15) 描述:

$$t_{1/2} = \frac{0.693[V_P + (V_T \cdot f_B / f_T)]}{Q} \quad (15)$$

例如,像普萘洛尔这样分布容积大的药物,血浆游离药物越少半衰期越短,剂量间隔期波动越大,但平均血药浓度无变化。而像青霉素这样分布容积小的药物,血浆或组织结合变化对半衰期影响很小。药物与组织结合变化的改变表现分布容积。因此,与组织结合的增加将导致半衰期的延长和分布容积的增加。

3. 浓度依赖性结合

当药物游离摩尔浓度远低于药物-蛋白复合物解离常数时,药物结合程度与浓度无关。当 K_D 值与治疗浓度相近时(图1),治疗剂量时药物可能发生非线性结合。丙戊酸对高亲和位点 K_D 值为 5×10^{-5} mol/L,游离治疗浓度为 $0.7 \times 10^{-4} \sim 2 \times 10^{-4}$ mol/L^[63]。水杨酸 K_D 值为 10^{-5} mol/L,游离治疗浓度为 $3 \times 10^{-5} \sim 7 \times 10^{-5}$ mol/L^[22]。也有关于抗炎药二氟尼柳^[64]、硫喷妥钠^[65]和二氮嗪^[66]非线性结合的报道,它们主要与白蛋白结合。丙吡胺在治疗范围内显示浓度依赖性结合^[2,67];利多卡因在治疗窗上限附近显示浓度依赖性结合^[68,69],这是两个重要的例子。在游离浓度非常低时可以观测到泼尼松龙的浓度依赖性结合,这可能与它和皮质激素传递蛋白的高亲和性有关^[70]。

对于浓度依赖结合的非限制性消除药物,如二氟尼柳,游离药物浓度随治疗剂量成比例增加,清除也随着游离分数而增加。虽然总体药物浓度也增加,但增加的比率较剂量增加比率小。此时,总体药物浓度可能会产生误导,剂量调节应当依据二氟尼柳的游离药物浓度,或根据患者的药效进行^[2,71]。

4. 全血与血浆清除

药代动力学参数应当从全血获得,但通常药物浓度是从血浆或血清中测得的。虽然组织和血浆游离分数不一样,但是达平衡时游离药物浓度是一样的,即 $(f_P C_P) = (f_B C_P)$ 。

测定药物在全血和血浆中药物浓度比有助于评价药物在红细胞中分布的重要性。药物与红细胞的结合通常是迅速可逆的。

和红细胞紧密结合的药物可能呈现浓度依赖性摄取,乙酰唑胺^[72]、氯噻酮^[73]和环孢素^[74]有相关报道。全血/血浆(B/P)浓度比测定值具有方法特异性。例如,环孢素,全血/血浆(B/P)浓度比在体温(37℃)测定为1.5~3.0,而在室温(20℃)为2.5~10.0^[75]。已有报道的与红细胞紧密结合的药物有丙噻、氯丙噻、普萘洛尔、水杨酸盐、苯巴比妥、喷他佐辛和苯妥英^[48]。

通常药动学参数是从血浆数据而不是全血数据中获得。然而,用血浆相关参数来测量器官摄取率和固有清除率可能会产生误导。当血浆结合与红细胞结合相似时 $C_B \approx C_P$, 因为 $f_B \approx f_P$ 。然而,当血浆结合比红细胞结合大时, $C_B < C_P$, $AUC_B < AUC_P$, 血浆清除率可能会导致低估全血清除

率,最大误差为40%。当 $B/P > 1$ 时,从血浆计算的清除率将使全血清清除率被显著高估,超出肝脏血流。

通常总体血浆药物浓度需要在血浆中测量。全血浓度可以通过式(16)来计算:

$$C_B = C_{RBC} \cdot HCT + C_P(1 - HCT) \quad (16)$$

式中: HCT 指血容积; C_{RBC} 指红细胞内的药物浓度。虽然药物与血浆蛋白的结合通常是可以迅速解离的,但一些报道表明有的药物与白蛋白的结合不可逆,如氯苯酰二甲基吡咯乙酸和氯灭酸的葡萄糖醛酸化产物^[76,77]。

5. 立体选择性

酸性药物立体选择性体现在白蛋白结合位点I和II上^[78]。有文献报道了布洛芬对映体与蛋白结合的立体选择性, R(-)构型平均游离分数为0.419%,显著低于S(+)构型0.643%。各种构型游离药物百分率在治疗范围内是浓度依赖性的,且受其光学对映体浓度的影响^[79]。有文献报道与相关蛋白结合有立体选择性的酸性药物有依托度酸、氟比洛芬、布洛芬、拉氧头孢、戊巴比妥、苯丙香豆素和华法林,碱性药物有氯喹、吡二丙胺、美沙酮、普萘洛尔、美西律和维拉帕米。Jamali等总结了一系列与人血浆蛋白发生选择性结合的异构体^[80]。

对映体与蛋白结合的立体选择性也具有种属差异性。与AAG结合的碱性药物普萘洛尔,其R构型在人和狗体内的结合比S构型少,而在大鼠体内恰恰相反。虽然狗与人有细微差别,但大鼠更显著^[81]。

虽然吡二丙胺的异构体互相竞争AAG上的结合位点,可造成体外 f_u 2~2.6倍的变化^[82],但没有发现体内异构体明显的相互作用,这主要与血清白蛋白的缓冲作用有关^[60]。志愿者静脉滴注维拉帕米后在体内异构体游离分数(R构型为 0.06 ± 0.01 , S构型为 0.12 ± 0.02),与体外给药前血清测定值相当。口服后各对映体游离分数相对较高。R构型为 0.13 ± 0.03 , S构型为 0.23 ± 0.03 。这种结合差异可能归因于其代谢物的竞争,口服后代代谢物达到了较高的浓度^[60]。

奎宁和奎尼丁互为对映体,其在正常人血浆中结合差异见诸报道^[1,2],分别为 $7.5\% \pm 2.2\%$ 、 $12.3\% \pm 2.3\%$ 。

药物与蛋白结合对药效的影响

游离药物与药理作用的联系最为紧密。因为方法上测定血浆或血清点的药物浓度更容易,而且游离与总药物浓度之比通常为常数,所以总药物的浓度普遍应用于治疗药物的监测。然而一些游离药物与总药物浓度的比率是可变的,疾病状态或药物相互作用下可能发生改变。一般而言,药物浓度监测是以血浆或血清代替全血是出于实际操作考虑,但全血的浓度更适宜,因为后者反映了参与分布的药物总量。

游离药物浓度监测

对于治疗范围内蛋白结合浓度依赖性的药物,以及在



疾病状态下游离分数发生显著变化的药物,监测游离药物可能是必需的^[83]。与在血浆中大部分游离的药物相比,高度结合($f_u < 30\%$)的药物更应当进行游离药物监测,这是因为后者的游离药物在一定条件下会发生显著变化。

通常在监测总血药浓度或游离药物浓度时,可能更有优势的药物包括卡马西平、苯妥英、丙戊酸、丙吡胺、利多卡因和奎尼丁^[84~86]。对于丙吡胺,监测游离药物应反映活性对映体的浓度^[87],然而对于这些药物游离浓度监测不推荐应用于所有患者,除非符合以下标准:①患有改变游离分数相关疾病的患者;②患者同时服用可能发生相互作用的药物;③在测定总药物浓度下,患者出现了意外的反应。

影响药物蛋白质结合与临床效果的因素

药物与蛋白质结合的变化可能与影响蛋白质浓度的因素、结合蛋白质的构象改变(如白蛋白)以及蛋白质结合位点的取代有关。蛋白质结合变化的结果临床上在治疗浓度时,对于高度结合($< 90\%$)的药物、分布体积小s的药物和治疗窗窄的药物更重要^[88]。表2列出了能改变蛋白质浓度的病理和生理因素。

1. 生理状况

1.1 年龄

新生儿药物与血浆蛋白如白蛋白、AAG的结合明显低于健康成人。新生儿在出生时AAG低,12个月以后达到正常浓度^[89]。影响结合降低的因素是存在新生儿蛋白,以及较低的白蛋白和AAG浓度。此外,新生儿胆红素和高血清浓度的游离脂肪酸可以竞争白蛋白结合位点^[90~93]。

新生长大后,白蛋白浓度的小幅度降低与水杨酸盐^[94]、地西泮^[95,96]、保泰松^[94]和丙戊酸^[97]结合降低有关。当然在新生长大后,AAG浓度的增加与其结合药物的增长有关^[98]。例如,AAG浓度的增加与该人群炎症疾病的发病率高有关。

1.2 妊娠

有报道表明妊娠晚期与妇女白蛋白结合的药物明显减少,这与白蛋白浓度降低,脂肪酸浓度增高有关,尤其是在分娩时。因此,水杨酸盐(70%~80%)^[64~69]、磺胺异噁唑(70%~80%)^[99]、苯妥英(30%)^[99~101]、地西泮(40%~60%)^[99,100]和丙戊酸(50%)^[100]的游离分数增加。

报道表明,与AAG结合的药物普萘洛尔^[92]、利多卡因^[92]和希比卡因^[102]在妊娠晚期游离的药物百分率上升35%~80%。分娩后白蛋白恢复至正常水平需要一个月,而AAG和脂肪酸只需要数天^[101]。

1.3 种族

以前大多数药物信息是从白种人身上得到的。一篇关

于药效种族差异的报告显示,中国人和白种人的药物血浆蛋白结合有差异。白蛋白结合药物华法林无差异,而中国人的利多卡因结合率明显偏低,与此相关的现象是结合蛋白AAG偏低^[103]。由于利多卡因毒性决定于游离药物,这种差异具有治疗意义。以前相似报道的还有普萘洛尔和丙吡胺^[104,105]。这种差异似乎不出现在与白蛋白结合的药物上。普萘洛尔和水杨酸的研究结果与华法林相似^[106]。

表2 与改变蛋白浓度相关的病理和生理因素^[43]

	白蛋白	AAG	脂蛋白
降低蛋白质浓度	急性热病性感染	衰老	家族缺乏 ¹⁾
	急性病毒性肝炎	肝硬化	甲状腺机能亢进
	急性胰腺炎	新生儿	低胆固醇饮食
	衰老 ¹⁾	口服避孕药	
	无白蛋白血 ¹⁾	怀孕	
	脑损伤 ¹⁾	严重肝病	
	癌症 ¹⁾		
	肝硬化 ¹⁾		
	囊性纤维病		
	甲状腺机能亢进		
	吸收不良		
	营养不良		
	新生儿		
	肾病综合征		
	妊娠		
	长期卧床休息		
	蛋白损失的肾病		
	肾衰竭		
增加蛋白质浓度	类风湿性关节炎		
	压力		
	手术 ¹⁾		
	外伤 ¹⁾		
	脱水	急性心肌梗死	饮酒中毒
	妇产科综合征	服用酶诱导剂 ¹⁾	降血压药
	精神病	衰老	糖尿病
	非特异性神经机能病	脑损伤 ¹⁾	家族型血脂蛋白过多症
		癌症	痛风
		慢性疼痛综合征	高胆固醇饮食
		炎症	甲状腺机能减退
		肺炎	肝病
		肾移植	肾病综合征
		手术 ¹⁾	胰腺炎
		外伤 ¹⁾	服用苯妥英或环孢菌素A
			怀孕
			肾衰竭

1) 该状况与主要变化有关。

1.4 性别、吸烟、肥胖、营养状态、外科手术

女性的地西泮游离浓度比男性高14%,而利多卡因无

明显差异^[107]。虽然 McNamara^[69]报道利多卡因与血浆蛋白结合率因吸烟从 0.31 减少至 0.26, 但是另一篇报道^[96]表明, 吸烟对利多卡因和地西洋与血浆蛋白结合无影响。

肥胖女性 AAG 的浓度加倍, 地西洋游离药物的浓度比正常体重的女性低 30%^[108]。肥胖女性白蛋白浓度和苯妥英结合率正常, 而地西洋结合率稍降^[108]。营养不良或住院的患者 AAG 浓度比非住院患者高 30%~40%, 地西洋游离分数大约降低 30%^[109]。有报道表明营养不良的人群白蛋白浓度显著降低, 这似乎与蛋白合成的减少有关^[81]。

外科手术后白蛋白浓度降低而 AAG 水平升高, 地西洋^[101]和奎尼丁^[111]游离分数下降 30%~40%, 而与白蛋白结合的苯妥英上升 100%~150%^[112,113]。奎尼丁属于与白蛋白结合的限制型消除药物, 术后浓度降低, 对游离药物浓度的影响不能预测^[111]。开胸手术患者头孢曲松游离浓度上升至正常 5 倍, 这是由于白蛋白浓度低而游离脂肪酸浓度高^[49,114]。

2. 疾病

2.1 肾脏疾病

造成血浆白蛋白浓度变化最常见原因是白蛋白减少症, 这与一系列生理和病理状态有关(表 2)。结合容量下降导致游离药物浓度上升。Gugler 等^[115]报道地西洋在肾病综合征慢性肾功能衰竭和尿毒症患者体内, 与白蛋白浓度和游离浓度成显著负相关性; 另有报道表明白蛋白药物结合率的减少与内源性抑制物质的蓄积相关^[116,117]。肾功能不全导致血浆蛋白结合率变化的药物见表 3^[43]。

表 3 与肾功能不全有关的血浆蛋白结合率的改变^[43]

结合下降		结合增加	
头孢菌素类	吠噻米	苯妥英	氯丙嗪
氯霉素	咪达唑仑	哌唑嗪	利多卡因
氯贝丁酯	吗啡	水杨酸	
地西洋	替普生	磺胺类药物	
双氯西林	青霉素 G	氨苯蝶啶	
二氮嗪	戊巴比妥	华法林	
二氟尼柳	苯巴比妥		
洋地黄毒苷	保泰松		

2.2 肝脏疾病

肝脏疾病所致药物结合的改变可能与白蛋白和 AAG 浓度下降有关, 蛋白浓度变化可归因于合成速度下降或血浆蛋白向肠腔流失。结合率变化也可能是内源性抑制物的蓄积如胆红素蓄积造成的^[59]。白蛋白结合的药物如地西洋和甲苯磺丁脲, 在慢性酒精中毒患者中平均游离分数比正常值高 65%~75%, 而且与白蛋白浓度相关^[118]。肝硬化患者 AAG 结合药物红霉素体内游离分数是对照组的 2~4 倍^[119], 而且与 AAG 浓度相关。据报道^[48]下列药物在肝脏疾病中游离分数增加: 哌唑嗪、普萘洛尔、吗啡、地西洋、

甲苯磺丁脲、保泰松、苯妥英、奎尼丁、氨苯蝶啶、茶碱和利多卡因。

2.3 炎症相关病理

AAG 是炎症急性反应期产生的一种蛋白。由于炎症、外源生理损伤和压力^[21,39,84,88,113]的存在, 患者体内 AAG 结合容量的增加是普遍的。AAG 水平升高将导致高度结合药物游离分数显著下降。这种例子包括心肌梗死患者服用的普萘洛尔^[120]、利多卡因^[121]和丙吡胺的结合率, 以及普萘洛尔和氯丙嗪^[122]在 Crohn 氏疾病患者体内结合率。

急性心肌梗死导致 AAG 浓度上升, 继而引发普萘洛尔和利多卡因(非限制性消除药物)游离分数下降。口服或静脉注射普萘洛尔剂量可能需要增加^[120]。建议使用利多卡因时采用正常输注速度, 这是因为总药物浓度随着输液时长而增加, 结合增加表明游离分数没有显著变化^[121]。

2.4 癌症与烧伤

癌症和烧伤病患者血浆 AAG 浓度上升而白蛋白浓度下降。利多卡因^[123]、美沙酮^[46]、普萘洛尔^[31]和丙咪嗪^[124]等 AAG 结合药物在上述疾病中游离分数上升 20%~30%, 而与白蛋白结合的药物甲苯磺丁脲上升 30%^[123]、地西洋 180%^[124]、苯妥英 150%^[125]。

2.5 糖尿病

糖尿病患者体内磺胺异噻唑血浆结合的减少与体内白蛋白糖基化有关, 而地西洋结合的减少可能是由于高浓度脂肪酸取代造成的^[126,127]。

2.6 甲状腺疾病

甲状腺机能亢进时血浆蛋白浓度下降而游离脂肪酸增加。据报道^[128]在上述情况下, 普萘洛尔和华法林游离分数增加 20%~30%。

2.7 胰腺囊肿性纤维化

胰腺囊肿性纤维化与血清白蛋白减少有关^[129]。患这种疾病的人体内茶碱游离分数比对照组高 30%^[128]。

3. 药物相互作用

药物亲和力变化可能与其他药物取代有关。竞争性取代将导致血浆药物游离分数增加, 被取代药物的表观解离常数 K_{Dapp} 可表示为

$$K_{Dapp} = \frac{K_D(1+[I])}{K_I} \quad (17)$$

式中: $[I]$ 代表血浆中游离抑制剂的浓度; K_I 为抑制剂解离常数。

与白蛋白结合的药物被取代的例子似乎比与 AAG 和白蛋白结合的药物多。例如, 利多卡因游离分数可在布比卡因治疗浓度(3~4mg/L)作用下显著增加^[130,131]。丙吡胺未见显著结合相互作用的报道, 它几乎专一地与 AAG 结

合^[2]。其他由于体内取代导致游离分数增加的药物见表4^[43]。

表4 由蛋白取代引起的体内药物相互作用

药物	取代剂	药物	取代剂
布比卡因	利多卡因	苯妥英	水杨酸
卡马西平	丙戊酸 ¹⁾		甲苯磺丁脲
头孢曲松	丙磺舒 ¹⁾		保泰松 ¹⁾
地西泮	丙戊酸 ¹⁾		丙戊酸 ¹⁾
甲氨蝶呤	水杨酸 ¹⁾	丙戊酸	水杨酸 ¹⁾
	丙磺舒 ¹⁾	华法林	二氟尼柳
	磺胺异噁唑 ¹⁾		保泰松 ¹⁾
青霉素	阿司匹林		
	磺胺甲氧嗪		

1) 该药还抑制肾小管分泌或取代剂的肝代谢。

4. 体外人为因素

使用真空管和肝素可导致蛋白结合测定的变化。研究显示肝素会减少如下药物的血浆蛋白结合：苯妥英、普萘洛尔、利多卡因、地西泮、奎尼丁和维拉帕米^[132~134]。这也视为导致脂蛋白酶离体活性和脂肪酸在血液采集管中蓄积的体外人为因素。

碱性药物游离分数高的原因是管帽塑料增塑剂占据AAG结合位点，而把药物置换下来了^[135,136]。因此管帽要使用新配方。结合率测定的改变也可能是储存容器和其他抗凝剂的原因。结合抑制剂如塑料增塑剂可能是丙吡胺结合率变化的原因^[2]。苯妥英和哌替啶在柠檬酸抗凝的血浆中测定的游离分数比肝素化的血浆或血清中高80%^[137]。

5. 药物注册方面的考虑

新药申请过程中应当提交药物在预期使用条件下质量、安全性和疗效的资料。因此化学、药代动力学、生物药剂学、药理学、毒理学和临床各个方面都需要研究和报告。这其中应包括蛋白结合的详细信息，强调群体风险性，如肾功能或肝功能不全及AAG变化的情况。美国、欧洲、日本三方国际协调会议(ICH)药效通用技术文件要求提交新活性物质蛋白结合的资料。应包括临床前和人药代动力学资料，这些资料要足以说明药物的生物处置及其与药效响应、治疗和(或)毒性效应之间的关系。此外对于药物间或其他的相互作用，蛋白结合变化的临床重要性和相互作用的机理应当确定，例如总的或游离浓度是否仅受初期取代影响，是否在长期用药时保持。

在药物各论中也有必要包含临床上有意义的蛋白结合的资料。这些资料有助于解释个体间和人群内药代动力学的变异，药动学变异表现在药效学差异上，而剂量调整是必要的。如上所述蛋白结合变化并不总是需要调节剂量，必须有足够的资料进行参考，并对患者提供安全和有效的治疗。

参考文献

- McDevitt, D. G.; Frisk-Holmberg, M.; Hollifield, J. W.; Shand, D. G. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1976, 20, 152-157.
- Lima, J. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1981, 219, 741-747.
- Evans, W. E.; Rodman, J. H.; Relling, M. V.; Petros, W. P.; Stewart, C. F.; Pui, C.; Rivera, G. K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992, 260, 71-77.
- Sebille, B. *Fund. Clin. Pharmacol.* 1990, 4 (Suppl. 2), 151s-161s.
- Davis, B. D. *J. Clin. Invest.* 1943, 22, 753.
- Pacifici, G. M.; Viani, A. *Clin Pharmacokinet.* 1992, 23, 449-468.
- Sebille, B.; Zini, R.; Madjar, C.; Thuaud, N.; Tillement, J. P. *J. Chromatog. Biomed.* 1990, 531, 1-77.
- Tozer, T.; Gambertoglio, G.; Furst, D.; Avery, D.; Holford, N. J. *Pharm. Sci.* 1983, 72, 1442-1446.
- Rehberg, P. B. *Acta Physiologica Scandinavica* 1943, 5, 115-126.
- Bowers, W. F.; Fulton, S.; Thompson, J. *Clin. Pharmacokinet.* 1984, 9 (Suppl 1), 49-60.
- Whitlam, J. B.; Brown, K. F. *J. Pharm. Sci.* 1981, 70, 146.
- Scott, D. O.; Bell, M. A.; Lunte, C. E. *J. Chrom.* 1990, 506, 461-469.
- Eklblom, M.; Hammarlund-Udenaes, M.; Lundqvist, T.; Sjöberg, P. *Pharm Res.* 1992, 9 (1), 155-158.
- Herrera, A. M.; Scott, D. O.; Lunte, C. E. *Pharm. Res.* 1990, 7, 1077-1082.
- Sjöberg, P.; Olofsson, I. M.; Lundqvist, T. *Pharm. Res.* 1992, 9, 1592-1598.
- Wong, S. L.; Wang, Y.; Sawchuk, R. J. *Pharm. Res.* 1992, 9, 332-338.
- MacKichan, J. J.; Zola, E. M. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1984, 18, 487-493.
- Metzler, G. M. *A User's Manual for NONLIN and Associated Programs*; The Upjohn Co.: Kalamazoo, 1974.
- Putnam, F. W. *The Roster of the Plasma Proteins*. The Plasma Proteins; Putnam, F. W., Ed.; Academic Press: New York, 1975; 57-131.
- Sadee, W.; Gravel, R. C.; Lee, A. Y. *Pharm. Biotechnol.* 1999, 12, 29-58.
- Tillement, J. P.; Lhoste, F.; Giudielli, J. F. *Clin. Pharmacokinet.* 1978, 3, 44-154.
- Jusko, W. J.; Gretch, M. *Drug Metab. Rev.* 1983, 14, 427.
- Peters, T., Jr. *Serum Albumin. The Plasma Proteins*;





- Putnam, F. W., Ed.; Academic Press: New York, 1975; 133—181.
24. Schmidt, K. α 1-Acid Glycoprotein. The Plasma Proteins; Putnam, F. W., Ed.; Academic Press: New York, 1975; 183—228.
25. Lunde, P. M. K. Inflammation and α 1-Acid Glycoprotein; Effect on Drug Binding. Drug-Protein Binding; Reidenberg, M. M., Erill, S., Eds.; Praeger Publishers: New York, 1986; 201—219.
26. Tinghely, D.; Baumann, P.; Conti, M.; Jonzier-Perey, M.; Schopf, J. Eur. J. Clin. Pharmacol. 1985, 27, 661—666.
27. Wagner, J. G. Protein Binding. Pharmacokinetics for the Pharmaceutical Scientist; Technomic Publishing Co. Inc.; Lancaster, PA, 1993; 243—258.
28. Urien, S.; Albengres, E.; Zini, R.; Tillement, J. P. Biochem. Pharmacol. 1982, 31, 3687—3689.
29. Urien, S.; Albengres, E.; Pinquier, J. L.; Tillement, J. P. Clin. Pharmacol Ther. 1986, 39, 683—689.
30. Milsap, R. L.; Jusko, W. J. J. Steroid. Biochem. 1983, 18, 191.
31. Abramson, F. P.; Jenkins, R. N.; Ostchega, Y. Clin. Pharmacol. Ther. 1982, 32, 659—663.
32. Baruzzi, A.; Contin, M.; Perucca, E.; Albani, F.; Riva, R. Eur. J. Clin. Pharmacol. 1986, 31, 85—89.
33. David, B. M. Br. J. Clin. Pharmacol. 1983, 15, 435—441.
34. Piafsky, K. M.; Borga, O. Clin. Pharmacol. Ther. 1977, 22, 545—549.
35. Edwards, D. J.; Lalka, D.; Cerra, F.; Slaughter, R. L. Clin. Pharmacol. Ther. 1982, 31, 62—67.
36. Abramson, F. P. Clin. Pharmacol. Ther. 1982, 32, 652—658.
37. Lemaire, M.; Urien, S.; Albengres, E. Lipoprotein Binding of Drugs. Drug-Protein Binding; Reidenberg, M. M., Erill, S., Eds.; Praeger Publishers: New York, 1986; 201—219.
38. Scanu, A. M.; Edelstein, C.; Keim, P. Serum Lipoproteins. The Plasma Proteins; Putnam, F. W., Ed.; Academic Press: New York, 1975; 317—391.
39. Piafsky, K. M. Clin. Pharmacokinet. 1980, 5, 246—262.
40. Lemaire, M.; Tillement, J. P. J. Pharm. Pharmacol. 1982, 34, 715—718.
41. Hughes, T. A.; Gaber, A. O.; Montgomery, C. E. Ther. Drug. Monit. 1991, 13, 289—295.
42. Lindholm, A.; Henricsson, S. Ther. Drug Monit. 1989, 11, 623—630.
43. MacKichan, J. J. Influence of Protein Binding and Use of Unbound Drug Concentrations. Applied Pharmacokinetics; Evans, W. E., Schentag, J. J., Jusko, W. J., Eds.; Applied Therapeutics Inc.; Vancouver, WA, USA, 1992; 33—37.
44. Gibaldi, M.; McNamara, P. J. Eur. J. Clin. Pharmacol. 1978, 13, 373—378.
45. Fichtl, B. Tissue Binding of Drugs; Methods of Determination and Pharmacokinetic Consequences. Plasma Binding of Drugs; Belpaire, F., Bogaert, M., Tillement, J. P., Verbeeck, R., Eds.; Academia Press: Ghent, 1991; 149—158.
46. D'Arcy, P. F.; McElnay, J. C. Pharmacol. Ther. 1982, 17, 211—220.
47. Klotz, U. Clin. Pharmacokinet. 1976, 1, 204.
48. Labaune, J. P. Fixation au Niveau Des Fractions Sanguines. Pharmacocinetique; Labaune, J. P., Ed.; Masson Publisher; Paris, 1984; 116—130.
49. Jungbluth, G. L.; Pasko, M. T.; Beam, T. R.; Jusko, W. J. Antimicrob. Agents Chemother. 1989, 33, 850—856.
50. Rowland, M.; Benet, L. Z.; Graham, G. G. J. Pharmacokinet. Biopharm. 1973, 1, 123—136.
51. Wilkinson, G.; Shand, D. Clin. Pharmacol. Ther. 1975, 18, 377—390.
52. Morgan, D. J.; Smallwood, R. A. Clin. Pharmacokinet. 1990, 8, 61—76.
53. Wilkinson, G. R. Plasma Binding and Hepatic Drug Elimination. Drug-Protein Binding; Reidenberg, M. M., Erill, S., Eds.; Praeger Publishers: New York, 1986; 220—232.
54. Gupta, S. K.; Benet, L. Z. Pharm. Res. 1990, 7, 46—48.
55. Meijer, D. K. F.; van der Sluijs, P. Pharm. Res. 1989, 6, 105—118.
56. MacKichan, J. J. Clin. Pharmacokinet. 1984, 9 (Suppl 1), 32—41.
57. MacKichan, J. J. Clin. Pharmacokinet. 1989, 16, 65—73.
58. Stoeckel, K.; Trub, V.; Buback, U. C.; McNamara, P. J. Eur. J. Clin. Pharmacol. 1988, 34, 151—156.
59. Blaschke, T. F. Clin. Pharmacokinet. 1977, 2, 32—44.
60. Gross, A. S.; Heuer, B.; Eichelbaum, M. Biochem. Pharmacol. 1988, 37, 4623—4627.
61. Tozer, T. N. Implications of Altered Plasma Protein Binding in Disease States. Pharmacokinetic Basis for Drug Treatment; Benet, L. Z., Ed.; Raven Press: New York, 1984; 173—193.
62. Kunin, C. M. Clin. Pharmacol. Ther. 1966, 7, 180—188.
63. Patel, I. H.; Levy, R. H. Epilepsia. 1979, 20, 85—90.

64. Lin, J. H. *Clin. Pharmacokinet.* 1987, 12, 402—432.
65. Morgan, D. J.; Blackman, G. L.; Paull, J. D.; Wolf, L. J. *Anesthesiology* 1981, 54, 468—473.
66. Pearson, R. M. *Clin. Pharmacokinet.* 1977, 2, 198—204.
67. Meffin, P. J.; Robert, E. W.; Winkle, R. A.; Harapat, S.; Peters, F. A.; Harrison, D. C. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 1979, 7, 29—48.
68. Tucker, G. T.; Boyes, R. N.; Bridenbaugh, P. O.; Moore, D. C. *Anesthesiology* 1970, 33, 287—314.
69. McNamara, P. J.; Slaughter, R. L.; Visco, J. P.; Elwood, C. M.; Siegel, J. H.; Lalka, D. *J. Pharm. Sci.* 1980, 69, 749—751.
70. Jusko, W. J.; Rose, J. Q. *Ther. Drug Monit.* 1980, 2, 169—176.
71. Lima, J. J. *Disopyramide. Applied Pharmacokinetics*; Evans, W. E., Ed.; Applied Therapeutics, Inc.: Spokane WA, 1986; 1210—1253.
72. Wallace, S. M.; Riegelman, S. J. *Pharm. Sci.* 1977, 66, 729—731.
73. Dieterle, W.; Wagner, J.; Faigle, W. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1976, 10, 37—42.
74. MacKichan, J. J.; Zola, E. M. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1984, 18, 487—493.
75. Van der Berg, J. W. O.; Werhoef, M. L.; De Boer, A. S. H.; Schalm, S. W. *Clin. Chem. Acta.* 1985, 147, 291—297.
76. Smith, P. C.; McDonagh, A. F.; Benet, L. Z. *J. Clin. Invest.* 1986, 77, 934—939.
77. Hynneck, M. L.; Smith, P. C.; Munafo, A.; McDonagh, A. F.; Benet, L. Z. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1988, 44, 107—113.
78. Simonyi, M.; Fitos, I.; Visy, J. *Trends Pharmacol. Sci.* 1986, 7, 112—116.
79. Evans, A. M.; Nation, R. T.; Sansom, L. N.; Bochner, F.; Somogyi, A. A. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1989, 36, 283—290.
80. Jamali, F.; Mehvar, R.; Pasutto, F. M. *J. Pharm. Sci.* 1989, 78, 695—715.
81. Belpaire, F. M.; Vermeulen, A. M.; Bogaert, M. G. *Stereoselectivity of Plasma Protein Binding and Its Pharmacokinetic Consequences. Plasma Binding of Drugs*; Belpaire, F., Bogaert, M., Tillement, J. P., Verbeeck, R., Eds.; Academia Press: Ghent, 1991; 137—147.
82. Lima, J. J. *Life Sci.* 1987, 41, 2807—2813.
83. Levy, R. H.; Moreland, T. A. *Clin. Pharmacokinet.* 1984, 9 (Suppl 1), 1—9.
84. Svensson, C. K.; Woodruff, M.; Baxter, J.; Lalka, D. *Clin. Pharmacokinet.* 1986, 11, 450—469.
85. Perucca, E. *Clin. Pharmacokinet.* 1984, 9 (Suppl 1), 71—78.
86. Woosley, R. L.; Siddoway, L. A.; Thompson, K.; Cerkus, I.; Roden, D. M. *Clin. Pharmacokinet.* 1984, 9 (Suppl 1), 79—83.
87. Lima, J. J.; Wenzke, S. C.; Boudoulas, H.; Schaal, S. F. *Ther. Drug Monit.* 1990, 12, 23—28.
88. Wilkinson, G. R. *Drug Metab. Rev.* 1983, 14, 427—465.
89. Bienvenu, J.; Sann, L. *Clin. Chem.* 1981, 27, 721—726.
90. Besunder, J. B.; Reed, M. D.; Blumer, J. L. *Clin. Pharmacokinet.* 1988, 14, 189—216.
91. Kurz, H.; Mauser-Ganshorn, A.; Stickel, H. H. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1977, 11, 463—467.
92. Wood, M.; Wood, A. J. *J. Clin. Pharmacol. Ther.* 1980, 29, 522—526.
93. Morselli, P. L. *Clin. Pharmacokinet.* 1976, 1, 81—98.
94. Wallace, S.; Whiting, B. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1976, 3, 327—330.
95. Greenblatt, D. J. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1980, 27, 301—312.
96. Davis, D.; Grossman, S. H.; Kitchell, B. B.; Shand, D. G.; Routledge, P. A. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1985, 19, 261—265.
97. Perucca, E.; Grimaldi, R.; Gatti, G.; Pirrachio, S.; Crema, F.; Frigo, G. M. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1984, 17, 665—669.
98. Kelly, J. G.; O'Malley, K. *Drug-Protein Binding in Old Age. Drug-Protein Binding*; Reidenberg, M. M., Erill, S. Eds.; Praeger Publishers: New York, 1986; 163—171.
99. Dean, M.; Stock, B.; Patterson, R. J.; Levy, G. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1980, 28, 253—261.
100. Perucca, E. *J. R. Soc. Med.* 1981, 74, 422.
101. Bardy, A. H.; Hiilesmaa, V. K.; Teramo, K.; Neuvonen, P. J. *Ther. Drug. Monit.* 1990, 12, 40—46.
102. Denson, D. D.; Coyle, D. E.; Thompson, G. A.; Santos, D.; Turner, P. A.; Myers, J. A.; Knapp, R. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1984, 35, 702—709.
103. Feely, J.; Grimm, T. *Br. J. Clin. Pharm.* 1991, 31, 551—552.
104. Zhou, H. J.; Roshaki, R. P. *New Engl. J. Med.* 1989, 565—570.
105. Zhou, H. J.; Adedoyin, A.; Wilkinson, G. R. *Clin. Pharm. Ther.* 1990, 48, 10—17.
106. Ghoneim, M. M.; Kortila, K.; Chiang, C. K.; Jacobs, L.; Schoenwald, R.; Mewaldt, S.; Kayaba, K.-O. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1981, 29, 749—756.
107. Routledge, P. A.; Shand, D.; Barchowsky, A.; Wagner, G.; Stargel, W. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1981, 30, 154—157.



Y

108. Benedek, I. H.; Fiske, W. D., III; Griffen, W. O.; Bell, R. M.; Blouin, R. A.; McNamara, P. J. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1983, 16, 751—754.
109. Jagadeesan, V.; Krishnaswamy, K. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1985, 27, 657—659.
110. Feely, J.; Forrest, M. B.; Gunn, A.; Hamilton, W.; Stevenson, I.; Crooks, J. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1980, 28, 759—764.
111. Fremstad, D. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1976, 10, 441—444.
112. Elfstrom, J. *Clin. Pharmacokinet.* 1979, 4, 16—22.
113. Elfstrom, J. *Acta. Neurol. Scand.* 1977, 55, 455.
114. Jungbluth, G. L.; Pasko, M. T.; Jusko, W. J. *J. Pharm. Sci.* 1989, 78, 807—811.
115. Gugler, R.; Azarnoff, D. L. *Clin. Pharmacokinet.* 1976, 1, 25—35.
116. Reidenberg, M. M.; Drayer, D. E. *Clin. Pharmacokinet.* 1984, 9 (Suppl 1), 18—26.
117. Niwa, T.; Takeda, N.; Maeda, K.; Shibata, M.; Tate-matsu, A. *Clin. Chem. Acta* 1988, 173, 127—138.
118. Thiessen, J. J.; Sellers, E. M.; Denbeigh, P.; Dolman, L. *J. Clin. Pharmacol.* 1976, 16, 345—351.
119. Barre, J.; Houin, G.; Rosenbaum, J.; Zini, R.; Dhumeaux, D.; Tillement, J. P. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1984, 18, 652—653.
120. Routledge, P. A.; Stargel, W.; Wagner, G.; Shand, D. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1980, 9, 438—439.
121. Routledge, P. A.; Stargel, W.; Kitchell, B. B.; Bar-chowsky, A.; Shand, D. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1981, 11, 245—250.
122. Piafsky, K. M.; Borga, O.; Odar-Cederlof, I.; Johans-son, C.; Sjoqvist, F. *New Eng. J. Med.* 1978, 299, 1435—1439.
123. Jackson, P. R.; Tucker, G. T.; Woods, H. F. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1982, 32, 295—302.
124. Martyn, J. A.; Abernethy, D. R.; Greenblatt, D. J. *J. Clin. Pharmacol. Ther.* 1984, 5, 535—539.
125. Bowdle, T. A.; Neal, G. D.; Levy, R. H.; Heimbach, D. M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1980, 213, 97—99.
126. Ruiz-Cabello, F.; Erill, S. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1984, 6, 691—695.
127. Erill, S.; Calva, R. *Post-Translational Changes of Al-bumin as a Cause of Altered Drug-Plasma Protein Bind-ing. Drug-Protein Binding*; Reidenberg, M. M., Erill, S., Eds.; Praeger Publishers: New York, 1986; 220—232.
128. Feely, J.; Stevenson, I. H.; Crooks, J. *Clin. Pharma-cokinet.* 1981, 6, 298—305.
129. Prandota, J. *Drugs* 1988, 35, 542—578.
130. McNamara, P. J.; Slaughter, R. L.; Pieper, J. A.; Wyman, M. G.; Lalka, D. *Anesth. Analg.* 1981, 60, 995—400.
131. Goolkasian, D. L.; Slaughter, R. L.; Edwards, D. J.; Lalka, D. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1983, 25, 413—417.
132. Wood, M.; Shand, D.; Wood, A. J. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1979, 25, 103—107.
133. Brown, J. E.; Kitchell, B. B.; Bjornsson, T. D.; Shand, D. G. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1981, 30, 636—643.
134. Dube, L. M.; Davies, R. F.; Beanlands, D. S.; Mous-seau, N.; Beaudoin, N.; Chan, B.; Ho-Ngoc, A.; McGilveray, I. J. *Biopharm. Drug Dispos.* 1989, 10, 55—68.
135. Borga, O.; Piafsky, K. M.; Nilsen, O. G. *Clin. Phar-macol. Ther.* 1977, 22, 539—544.
136. Midha, K.; Loo, J. C. K.; Rowe, M. *Res. Commun. Psychol. Psychiatry Behav.* 1979, 4, 193—203.
137. Jackson, A. J.; Miller, A. K.; Narang, P. K. J. *J. Pharm. Sci.* 1981, 70, 1168—1169.

(支晓瑾 译)

药物的多态现象

Harry G. Brittain

Center for Pharmaceutical Physics, Milford, New Jersey, U. S. A.

引言

自从 18 世纪中期,人们就已经了解到许多物质有一种以上的晶型,并由此应用了一些当时具备的定性工具来彻底地研究这些固体的性质(如晶体形态学、熔融现象等)^[1]。最终 von Laue 和 Bragg 在晶体的 X 射线衍射方面的工作推动了技术的发展,该技术能够直接研究这种物质的结构,并提供后来称之为多形态现象的结构确证。

业已证明一种给定的化合物在晶态方面所具有的结构性质能够深远地影响这个体系的固态性质。对于一种物质,它的热容、传导率、体积、密度、黏度、表面张力、扩散率、晶体硬度、晶型和颜色、折光指数、电导率、熔融和升华性质、熔融潜热、溶解热、溶解度、溶解速率、转变热焓、相图、稳定性、吸湿度以及反应速率都受晶体结构性质的影响。

随后,在药学相关领域内的研究者意识到,因晶型不同引起的固态物质的性质变化也能表现在药学中某些重要性质的变化^[2]。例如,已经发现各种多晶型药物具有不同的溶解度和溶解速率,并且有些时候这些差异性能导致不同晶型的药物不等效。因此,人们认识到,药物可能的多晶型需要在药物开发的早期仔细研究。在各种文献里已经有报道,大多数的药物都具有多晶型的现象^[3,4],如果遇到一个化合物只能形成一种晶型我们应该感到惊讶。

理论概念

一个多晶型体系的完整性质应该是以各个相的热力学性质为基础的。固相具有均一的结构和组成,并且能够通过确定的边界与其他相分离开来,当它在一定的环境条件下,某一固相变得不稳定时就进行相转化。相转化的过程是由与结构和组成有关的转化自由能决定的。经典的热力学提供了一个理解这种转化性质的基础。

在相转化过程中,体系的自由能是保持连续的,但是熵值、体积和热容则在不连续地变化。相转化按相转变过程中不连续变化的 Gibbs 自由能的导数的级数分类。Gibbs 自由能(G)是由焓(H)和熵(S)定义的:

$$G = H - TS = E + pV - TS$$

式中: T 是热力学温度; p 是压力; V 是体积; E 是能量。在这个公式中我们可以清楚地看到,在体积和熵值(也就是说,需要转化潜热)里进行的非连续的转化是一级反应,但是有关热容、热膨胀和可压缩性的非连续变化的转化则是二级反应。

这个经典的 Clapeyron 方程准确地描述了一级相变反应的特征,而且通过特意改变压力和温度,适用于很多一级相变反应的例子^[5]。而二级或者更高级的相变反应就不能够通过经典的热力学进行解释了。不像一级相变转化,在转化温度处两相的自由能表面能够急剧交叉,很难形象地描述在二级或者更高级的相变中的自由能界面的性质。在二级相变过程中,在转化温度处的热容以及热膨胀和热压缩可以测定,使分析复杂化。

在一设定的环境中,具有最低自由能的晶态是最稳定的($G'_{\text{亚稳态}} > G_{\text{稳态}}$),亚稳态最终都会转化成最稳定的形态。如果同时改变 p 和 T ,使 $G'_{\text{亚稳态}} = G_{\text{稳态}}$,那么就会发生可逆的相变反应,称之为对映现象(enantiotropy)。然而如果在任何 p 、 T 值下, $G'_{\text{亚稳态}} > G_{\text{稳态}}$,则任何亚稳态向稳态的转化过程都是不可逆的,这被称为单变性(monotropy)。

一般会认为,能够预测一个多态体系的各种相变相对稳定性的关系比热力学参数的绝对值要重要。虽然通过不同结构的晶格能计算能量差^[6],但是大多数研究者一般都会使用过去已经建立的具有权威的经验规则^[7]。例如,既然 $G'_{\text{亚稳态}} > G_{\text{稳态}}$,那么稳态蒸气的压力一定比亚稳态的蒸气压小。

人们提出了很多经验规则用来推断多形态体系的稳定性顺序,以及相互转化(如对映性到单变性)过程的性质。比较有名的是热量转换定律,它所说明的是,如果在某个温度下观察到吸热转化,那么,一定存在一个较低温度下的转化点,这两种形式具有互换的关系。相反,如果在某个温度下有一放热转化,那么就可以推断出在较低温度下无转化点。这反过来也可以说明要么这两种形式是互变的关系,要么转化的温度比放热温度高。

另一个经验规则是热熔定律,它的内容是,如果一个较高熔点的形态与另一个较低熔点的形态相比有更低的熔融热,那么这两种形态之间就是互变的关系。密度定律不是很严格遵守,它说的是,密度最高的形态在绝对零度是最稳定的。严格来讲,密度定律只适用于分子内氢键不是主要影响因素的分子固体的多形态。

结构方面

理想的晶型应该是相同的结构单元在空间规则地重复。有人用周期晶格这一词或者在一个给定结构内的线状连接的 3D 格子等词来定义晶体的这种对称的性质。这个重复的图形称为单元细胞(每一个单元细胞都典型地含有一组分子),每一个单元细胞都位于晶格点上。这种单元细胞由沿着它的晶体轴(α 、 β 和 γ)及晶体轴之间的晶体角的投影



值 (a 、 b 和 c) 来定义。晶体的这种对称性最终在它的晶体空间群中表现出来, 这是定义晶体的周期结构的完整对称操作。

当考虑到有机分子的结构时, 发现不同的修饰能够形成两种主要的识别方法。如果这些分子强迫以刚性的原子组合存在, 那么这些原子将会以不同的图形堆集起来以占据不同晶格的点。这种多形态的类型是聚集现象的主要原因, 所以就被称为聚集多形态 (packing polymorphism)。从另外一个方面来讲, 如果所讨论的分子不是刚性的, 且能够以不同的构象形态存在, 那么每一个这些构象上不同的修饰就会在它们各自的晶格结构内进行结晶。后面的这种行为称为构象多形态 (conformational polymorphism)。

1. 聚集多形态

在应用单晶 X 衍射图谱来确定有机分子结构的最早的研究中, Robertson 报道了间苯二酚结构^[9]。这个与在室温条件下通常获得的相应的晶体物质, 后来被称为 α 晶型。此后不久, 发现当 α 晶型在 74°C 加热的情况下, 能够转变成密度更大的晶体形式 (称为 β 晶型), 而且这种构型与原来的完全不同^[10] (图 1)。

本质上, 间苯二酚被限制在一个单一构造内, 从图 1 我们可以清楚地进行比较发现, 每一个构型都以不同的氢键形状作为特征。可以看到 α 晶型是一个相对开放的结构, 是靠晶体各个平面的螺旋上升的氢键维持的。按图中的标识 (ab 平面) 观察, 外观上相互靠近的四组羟基很明显地是通过这个上升螺旋的一个切面。热诱导相转化的结果就是 α 晶型的这种开放式的排列被一个更加紧密的、分子平行排列的 β 晶型所代替。这种结构的变化导致了从 α 晶型 ($1.278\text{g}/\text{cm}^3$) 到 β 晶型 ($1.327\text{g}/\text{cm}^3$) 密度的增加。事实

上, 这种存在 β 晶型中的分子聚集被认为是比烃基化合物更具典型性的碳氢化合物^[10]。

2. 构象多形态

有报道降胆固醇药物普罗布考 (4, 4'-[(1-甲基亚乙基) 双硫] -双-[2, 6-双(1, 1-二甲甲基) 苯酚]) 有两种晶型^[11]。晶型 II 与晶型 I 比较有较低的熔点, 而且在长期的存放过程中, 晶型 II 能够自发地向晶型 I 转化。这两种多态构型的结构已有报道, 图 2 给出了晶型的详细结构。

普罗布考的两种晶型分子构型有很大的差别。在晶型 II 内, CSCSC 链是伸展的, 分子的对称性接近 C_{2v} , 而在晶型 I 中就没有这种分子的对称, 两个 CS 键之间的扭力角度明显偏离 180° 。在两个构型中, *t*-丁基对苯酚基团的空间挤压明显偏离两个苯酚的碳原子的三角结构。利用数学计算模型, 作者发现, 晶型 II 的能量比晶型 I 要高 $26.4\text{kJ}/\text{mol}$, 这说明, 较不对称的结构相对比较稳定。晶型 I 的晶体密度大约高出晶型 II 5%, 这说明晶型 I 的分子构型状态能够产生更有效的空间填充。

3. 溶剂化多态现象

溶剂化多态可以定义为晶体中含有溶剂分子, 溶剂分子通过特定的位置替换, 并且通过平移对称与其他溶剂相关。关于存在的其他类型结构化溶剂^[12], 在这里就不讨论了。因为水是一种到处存在的物质, 所以物质最重要的溶剂化多态都是水进入到晶体晶格内部形成的。

氨苄西林是一种抗生素, 已经发现它可以以一种三水合物、至少两种无水形式结晶, 而且这三种结晶已经被进行严格的比较^[13]。在水存在的环境下, 这两种形式的转化

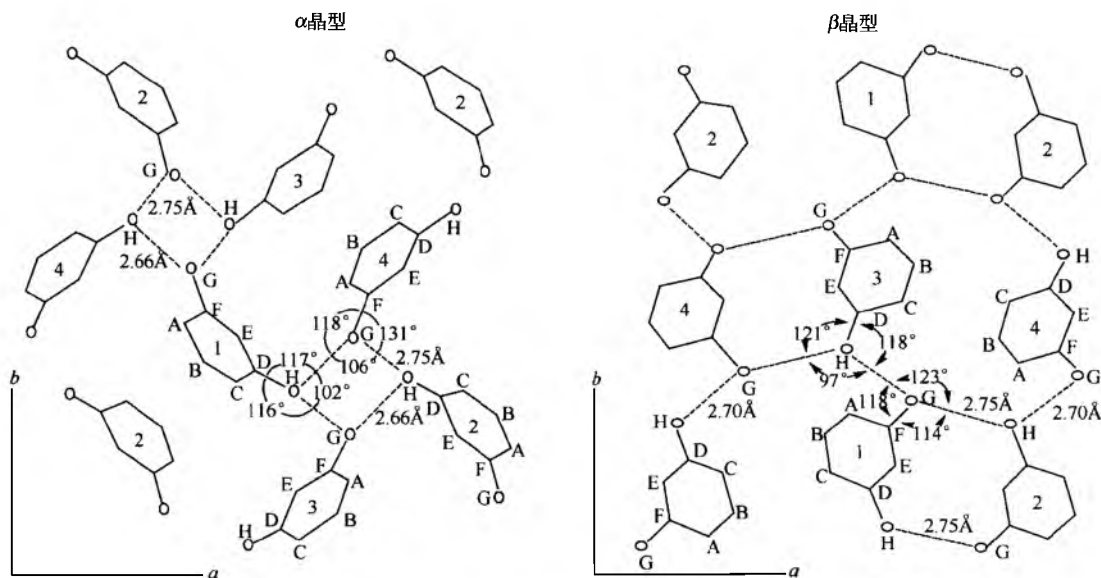


图 1 间苯二酚的 α 晶型和 β 晶型的结构 [从 c 轴看或者 (001) 晶体面观察]^[9,10]

易溶解的低熔点的晶型很难结晶。两个熔点的差别越小,就越容易获得不稳定或亚稳定型。

表 1 常用于分离多晶型化合物和溶剂化物的溶剂

溶剂	沸点/℃
两性性	
二甲基甲酰胺	153
乙腈	81
二甲基亚砷	189
N-甲基吡咯烷酮	80
质子溶剂	
水(不同 pH)	100
甲醇	65
醋酸	115
乙醇	78
异丙醇	82
正丙醇	97
正丁醇	118
Lewis 酸	
二氯甲烷	40
氯仿	61
Lewis 碱	
丙酮	56
2-丁酮	80
四氢呋喃	66
乙酸乙酯	77
甲基丁基醚	56
芳香族	
甲苯	111
二甲苯	140
噻吩	115
非极性的	
正己烷	69
环己烷	81

另外一种通常使用的结晶化方法是控制温度的变化。如果一种化合物在较高的温度下更容易溶解,那么缓慢地冷却这种热的、饱和的溶液,可以有效地生产出晶体;如果一种化合物在较高的温度下溶解反而少,则应该缓慢地升温。有时加热使溶液沸腾,过滤移去过多的溶质,再用冰浴甚至是干冰-丙酮浴使之冷却,这样的方式反而会更好。

有时动力学决定结晶过程,并且热力学变成第二个需要考虑的因素。正如 Ostwald 定律中陈述的:“当离开一个不稳定的状态,一个系统不会去寻找最稳定的状态,而是通过失去自由能到达最近的亚稳定态”。通过溶解和结晶化过程,这种晶型转变为第二种最容易溶解的晶型。因为晶体的形成受动力学因素的控制,所以通过快速过滤使亚稳定形态从结晶溶剂中分离出来非常关键,随后的相转变就不会发生。

在对溶剂结晶法获得的固体定性过程中,有人发现热

处理可能是生产一种新晶型的方法。举例来说,当用差示扫描量热法作为分析手段时,会发现吸热峰对应于相转化,紧接着的第二个吸热峰对应于熔融。有时在这两个吸热峰之间会有一个放热峰,表示一个结晶化过程。在这种情况下,通过热处理通常能够制得高熔点的多晶型。

按照 Ostwald 定律,通过冷却熔融的多形态物通常会产生产生最不稳定的形态,随后通过几步重排转化为稳定的形态。因为亚稳态形式有较低的熔点,因此过冷对于从熔融状态结晶是很必要的。在熔化后,系统必须过冷到亚稳态形式的熔点以下,而同时必须防止更稳定形式的结晶。冷却熔化的物质,有时会形成无定形固体,如果加热会发生玻璃化然后结晶。

物质通常在晶格的特定位置因含有水和溶剂分子而结晶,新的晶型称为溶剂化物。因为水是药学可以接收的溶剂,水合物对于药物的开发具有很重要的作用。水合物的种类很多并被人们加以总结^[12]。绝大多数溶剂化物形成时溶剂与分子的比率为整数,但并不总是如此。

在最简单的类型中,水与无机阳离子结合作为配合物的一部分。这种类型的水称为结晶水,无机化合物中比较普遍。例如,硫酸镍形成一种明确的六水合物,且结合水直接与镍离子(二价)结合。详细研究还包括与有机分子形成的多种水化物,水分子在整体结构中桥接结构单元。最终,水分子可能以半成品状态存在,衬在这种晶体结构中的空穴内。最后这种水化类型常被命名为管道水化物。

通常水化物由从水中重结晶获得。例如,盐酸曲唑酮四水合物通过将无水物溶于热蒸馏水中,室温放置过夜,并且将收集到的晶体置于相对湿度 75% 和 25℃ 下,直到它们达恒重^[16]。水合物有时可以将无水物悬浮在水中而得到,该过程类似于 Ostwald 成熟过程。例如,无水甲硝唑苯甲酸酯的水悬浮液是亚稳态的,存储于 38℃ 以下可导致一水化物形成并且伴有晶体成长^[17]。将无水粉末暴露于相对湿度较高的地方,经常会产生新的水合物。例如,实验性的抗胆固醇化合物 SQ-33 600 暴露于各种相对湿度环境中时,能形成多种水合物^[18]。

特性描述方法

一旦采用适当的多晶型方案生产出多种类型的结晶固体,这时对它们采用适当的技术表征非常重要,从而这个系统可以更好的定义。幸运的是,可以获得适合于描述药物固体特性技术的广泛讨论^[19,20]。最重要的表征技术——单结晶 X 射线衍射,在前面已经与多晶型现象一起讨论过了。当然所有可能的多晶型结晶化物和溶剂化物结构的确定,会组成最终的表征,特别是当你能对同样的结晶同时用分光镜和热法进行结构测定。这个情况很少出现,所以通常引入、使用一系列额外的技术。

在所有表征固体物质物理性质的方法中,通常认为结晶学、显微学、热分析、溶解度研究、振动分光学、核磁共振是最有用的描述多晶型和溶剂化物的方法。然而,特



别重要的是确定存在多晶型类型的标准通常与晶体结构不等价。对于药用化合物,这通常意味着各种可疑的多形态可以观察到不等价的 X 射线粉末衍射图。必须考虑所有其他的方法学作为辅助信息的来源,但它们本身不能作为存在多形性的明确证明。

一个正确制备的固体粉末样品将在粉末界面完全随机出现所有可能的结晶面选择,并且这些表面的衍射能提在晶格上所有可能的原子的间距信息^[21]。观察的散射角和间距之间的关系与分子在晶格上的位面组成 Bragg 定则:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

式中: n 是衍射线的级数; λ 是入射 X 射线的波长; d 为位面与晶体之间的距离; θ 是衍射线观察角度。为了测量粉末样式,制备任意方向的样品以暴露样品所有的位面,照射单色 X 射线,观察连续的 X 射线散射并测量其角度。

一个极端重要的表征多晶型和溶剂化物的工具是显微镜法,因为不同晶体结构的可观察晶癖一定是不同的,所以这对于系统表征是有用的^[22]。显然,视觉观察到材料可能有多晶型或是溶剂化物,应该立即研究其结晶学,即称为光学结晶学的学科^[23],它是任何研究项目的基础。光学和电子显微镜广泛用于描述多晶型和溶剂化物的特性。虽然光学显微镜在适合日常工作的放大倍率上受到较大的限制,当观察微晶质材料时,超过 600 倍就很困难,但是偏振光的使用使这项技术变得更加强大,而其他方法难以实现。电子显微镜能实现极高的放大倍率,大多数仪器在 9 万以上,并且可以获得包含相当程度 3D 信息的图像。

热显微镜常被称为熔融显微镜或热阶段显微镜,是描述多晶型或溶剂化物体系特性的极其有价值的工具。该技术要求在观察时,加热和冷却显微镜载玻片上几毫克物质,同时观察结晶的材料^[24]。因此仅仅使用很少量的材料就能进行快速的分析,而且药物材料的整个相位图可以通过进行设计合理的实验推导出来。在热显微研究中使用最广泛的设备是热态 Kofler,它推动了大量的研究的进行^[25]。

热分析方法可以定义为这样一些技术,即测定分析物的性质作为外加温度的函数。不管可观测的参数如何,通常要求能连续地和自动地记录物理性质和样品温度,并且样品温度按预先设定的速率改变。在性质上热反应可能吸热,如熔化、沸腾、升华、气化、去溶剂、固-固相转化、化学降解等,或放热如结晶和氧化分解等。这样的方法普遍应用于制药工业中,用于描述化合物的纯度、多形性、溶剂化、降解和与赋形剂相容性^[26]。

虽然已经开发了大量的热分析技术,但是最常应用的是热重分析法(TG),即测量热量引起的材料质量减少与外加温度的函数关系;差示热分析(DTA),即测量样品和对照品之间温度差值与外加温度的关系;差示扫描量热法(DSC),即测量样品和对照品之间热容差别与外加温度的关系。DTA 和 DSC 用于研究多晶型和溶剂化物物质,主要是获得发生任何相转化与温度的关系的信息。

热分析法最简单和最直接的应用是研究多形态的相对稳定性。例如,从 DTA 热图能推断市场上一种氯喹二磷酸

为纯净相,而另一种为两个多晶型的混合物^[27]。使用 DTA 分析可以证明,尽管可以获得不同晶癖的磺胺甲噁唑,实际上都包含相同的无水多晶型^[28]。在一项旨在研究螺内酯的三种多晶型、五种溶剂化物的溶出曲线实验中,采用 DTA 分析和粉末 X 射线衍射来确定各种材料的特性^[29]。

DSC 分析也能用于获得化合物熔化温度,这样的信息对于建立多晶型系统的相对稳定顺序具有较高价值。另外,对于适当的系统,该技术可以用于研究发生在 DSC 研究中的任一阶段的任何相转化。例如,碘番酸的 I 型在 154℃ 形成唯一熔化吸热峰,但 II 型的热图要复杂得多^[30]。发现 II 型在 133℃ 有一吸热峰,为 I 型的熔融相变;在 141℃ 出现一放热峰,结晶为 II 型;153℃ 又有一吸热峰,为重结晶的 II 型的熔融。

DSC 分析是热分析中的优越方法的代表,DSC 峰面积与吸热或放热直接成比例,并且峰面积的积分为反应焓,单位是 cal/g 或 J/g。尽管基于熔化焓得出结论因未考虑熵的贡献而不准确,但反映系统中热力学内在的趋势通常是可能的。例如,根据热分析和平衡溶解度测量,可以推断盐酸莫西罗酮的相同多晶型^[31]。另外,对于金诺芬,基于熔点和熔融热可以预测一种无水多晶型是最稳定的,但是溶解性试验表明另一种多晶型实际上是热力学稳定的形式^[32]。

能量与化合物的振动方式的联系可以通过直接观察它们在光谱的红外区的吸收度,或通过观察由一个强光穿过样品的低能散射带(Raman 效应)。在一个多形态系统中,当振动方式与分子的联系因为不同晶体结构而改变时,这些方法可以用于多晶型和溶剂化物的分光研究^[33]。

当多晶型系统的 FTIR 光谱明显不同时,结果也许能较容易地鉴别一个特定形式。例如,盐酸雷尼替丁的两个形式的光谱在 3000cm⁻¹ 之上以及 2300~2700cm⁻¹ 和 1570~1620cm⁻¹ 的范围内不同^[34]。扎诺特隆能以很多种形式结晶,且每个产生一个特征红外光谱^[35]。当溶剂分子包在晶格中时,新结构与原来无水相的结构经常显著不同,所以改变了许多分子的振动方式。

也可以使用 Raman 分光法研究化合物的振动方式,即在不吸收的介质中测定射线的无弹性散射^[36]。虽然红外吸收和 Raman 散射给出同样振动谱带的能量信息,但是熟练的工作者能通过决定每种分光法谱带强度的不同选择规则加以使用。例如,两种类型的振动光谱被用于尼莫多平的多形性研究,通过强度关系可以明显地发现,虽然每种技术产生振动过渡跃迁的概述,谱带强度的本质变化还是容易辨别的^[37]。

一种描述原料特性的技术正变得越来越重要,即固态核磁共振光谱学,并且这种方法应用于药学已经有详细的证明^[33, 38]。多晶型或溶剂化物的核磁共振光谱中经常包含相似核子的非等价共振峰,因为分子环境的紧密细节与不同的晶体结构相联系可能导致核共振能量的波动。

在其最简单的应用中,固态核磁共振波谱学可以用于定量区别多晶型和溶剂化物,多数与振动光谱的方式一致。

当得到详细的固态光谱时, 该技术可以用来推断导致结晶变化的分子构象的不同。在福辛普利钠的开发期间, 得到了一种晶体结构的最稳定态, 但这样的结构没有能在其亚稳阶段获得^[39]。固态振动和核磁共振波谱学的研究, 可以推断固体多晶型与乙酰化侧链的不同结构相关。核磁共振数据还表明两种多晶型在构象上的另外差异还与肽键的顺反式异构有关, 后者反过来导致非等价的分子出现在结构单元中。

固态核磁共振技术还可用于定量测定相组成, 已报道的有卡马西平的无水和二水合物相^[40]。应用固态¹³C-核磁共振波谱研究多晶型和溶剂化物质, 不仅可以评价共振带位置, 还可利用另外的波谱特征。例如, 咪唑米多晶型的弛豫时间的研究用于显示在Ⅱ型中有更多的分子流动性和无序, 而Ⅰ型是更刚性和均匀有序的^[41]。

多形态和溶解度

因为不同的多晶型或溶剂化物的晶格能量(和熵)会导致大量的物理性质的差异, 所以不用怀疑同一家族的不同形式存在着不同的溶解度和溶解速率^[42]。变化的溶解性反过来对于将药物制成药品过程很重要^[43], 而且可能对活性成分从剂型中的吸收有影响^[44]。具有较高晶格自由能的固体(如较不稳定的多晶型)将溶解较快, 因为存储的大量晶格自由能的释放将有利于增加溶解度, 也是溶解的驱动力。同时, 每个品种将释放(或消耗)同样的溶剂化能, 因为所有溶解的品种(化学实体相同)必须在热力学上相等。同一药物实体的不同结构可能具有不同的溶解速率, 反过来又可能会导致不同多晶型或溶剂化物不同程度的生物利用度。

溶解度测定用来表征 3-(((3-(2-(7-氯-2-噻啉)-(E)-乙烯基)-苯基)-((3-二甲氨基-3-氧代丙基)-硫代)-甲基)-硫代)-丙酸的多晶型^[45]。在异丙醇中Ⅱ型的溶解度高于Ⅰ型(5~55℃的异丙醇中溶解度比为 1.7), 在甲基乙基酮中也是如此(甲基乙基酮中在 5~55℃范围溶解度比为 1.9), 表明Ⅰ型在此温度范围内热力学比较稳定。一项关于熵对溶解过程中溶液自由能贡献的分析表明, 饱和的异丙醇溶液比相应的甲基乙基酮溶液更加混乱, 进一步显示在甲基乙基酮溶液中存在着较强的溶质-溶剂的相互作用。

已发现保泰松能够以 5 种不同的多形态结构存在, 其 X 射线衍射图和熔点均不同^[46]。当Ⅰ型显示最高的熔点(显示在较高的温度下能量结构最少), 在研究的三个溶剂化系统中它的溶解平衡是最低的(显示最低的自由能)。这些结果表明, 在室温和熔点(105℃)时Ⅰ型都是热力学上最稳定的多晶型。在任何特定的温度下确定其他形式的稳定性顺序并不直接, 结论是在室温下稳定性顺序与在 100℃时不一样。这清楚地表明, 一些形式是对映异构的, 其他的是单变性的。

当给定化合物的水合物或溶剂化物在一种溶剂中相变稳定, 则该品种的平衡溶解度可以用来描述这些系统的特

性。例如, 在 55℃ 氨苄西林三水合物的平衡溶解度大约是室温下其更稳定的无水物的 1.3 倍^[47]。然而, 在 42℃ 的转化温度下, 无水相更容易溶解, 因此也就更加不稳定一些。

溶解的量热测定在一个层面上仅仅能获得一给定溶质溶液的焓, 或者可以用于更深层的理解来获得关于热力学系统的完整描述。在给定的温度范围内测定溶解性数据, 可以用来计算一给定多形态的微分溶解热。可以通过减去两个多晶型的微分溶解热来推导两种形式转化的能量(ΔH_{trans}):

$$\Delta H_{\text{trans}} = \Delta H_{\text{S}}^{\text{B}} - \Delta H_{\text{S}}^{\text{A}}$$

式中: $\Delta H_{\text{S}}^{\text{A}}$ 和 $\Delta H_{\text{S}}^{\text{B}}$ 分别表示多晶型 A 和 B 的微分溶解热。在相关温度下对于一给定物质的溶解热不变的假设的验证, 可以通过计算两种形式的溶解焓(ΔH_{F})来决定, 得到其差值

$$\Delta H_{\text{trans}}' = \Delta H_{\text{F}}^{\text{B}} - \Delta H_{\text{F}}^{\text{A}}$$

式中: ΔH_{trans} 代表了在熔点时两种形式 A 和 B 的转化热。当作了足够的假设, 人们推测 ΔH_{trans} 和 $\Delta H_{\text{trans}}'$ 应该相等, 而且差示扫描量热法结果可以用来检查溶解热量测定的结果。例如, 对于金诺芬的多晶型的熔化和溶解热已经有报道了^[32]。推算出的 95% 的乙醇中 (2.90 kJ/mol) 和在二甲基酰胺中 (2.85 kJ/mol) 的转化热与在熔点时转化能 (3.20 kJ/mol) 上的相似性提供了这个多形态系统热力学的直接估计。

为了说明自由能变化的重要性, 对由盐酸帕罗西汀形成的溶剂化系统进行评价, 该药可以以不吸湿性的半水合物或吸湿的无水物存在^[48]。两种形式的转化能可以通过差示扫描量热法 ($\Delta H_{\text{trans}}' = 0.0 \text{ kJ/mol}$) 测定, 也可以通过溶解热测定 ($\Delta H_{\text{trans}} = 0.1 \text{ kJ/mol}$), 结果显示这两个系统是等焓的。但是, 转化自由能 (-1.25 kJ/mol) 有利于无水物向半水合物的转变, 这种相转变可能始于晶体压缩或晶种技术。因为这两种形式基本上是等焓的, 随着相的转变, 焓增加是造成自由能减少的原因, 并且也是转化的动力。

对于多形态系统热力学的基本了解要求测定不同形式之间的自由能差别。3-氨基-L (m-三氟代甲基苯基)-6-甲基-1-H-邻二氮杂苯基-4-酮的两个多晶型被用许多的方法研究, 其中溶解性研究用来评价从Ⅰ型到Ⅱ型的热力学^[49]。在 30℃, 两相转化的焓变化是 -5.64 kJ/mol。从两种多晶型的溶解比, 自由能变化计算为 -3.67 kJ/mol, 显示伴随转化的焓变化是 -6.48 kJ/mol。在这个系统中, 遇到了一个相的变化, 这对于焓有利, 但对于熵不利。但是, 由于整体的自由能变化 (ΔG_{trans}) 为负数, 这个过程自发进行, 只要分子能以显著速度克服活化能的阻碍。

在另一些情况下, 发现不利的焓可作为有利的熵的补偿, 从而使消极的自由能变化与某一特殊相的变化联系起来。拉米夫定有两种形式, 一种是从水中或从甲醇中获得的 1/5 水合物, 另一个是非溶化的, 是从许多非水溶剂中获得的^[50]。Ⅱ型在热力学上对于固相很有利。对两种形式均进行了溶解度与溶剂和温度关系的研究, 以确定焓或熵

是不是溶解的动力。溶解热数据显示, 单独基于焓, I 型对于研究的所有溶剂是有利的。在乙醇及其他有机溶剂中, I 型比 II 型有更大的溶液熵, 补偿不利的热焓因素, 并得到相变总的负自由能。

人们普遍认为, 研究溶解速率最好采用紧密材料进行, 紧密物质的形成过程控制微粒的大小和固体的表面积。这项工作可得到特性溶出速率, 这种趋势通常与从平衡溶解度中得出的推论相类似。因为在恒定的水动力学环境下, 特性溶解速率与溶解固体的溶解度成正比, 最稳定的多晶型物的特性溶解速率最慢。

参考文献

- Verma, A. R.; Krishna, P. *Polymorphism and Polytypism in Crystals*; John Wiley & Sons: New York, 1966; 1-7.
- Brittain, H. G. *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1999; 331-361.
- Borka, L.; Haleblan, J. K. *Crystal Polymorphism of Pharmaceuticals*. *Acta Pharm. Jugosl.* 1990, 40, 71-94.
- Borka, L. Review on Crystal Polymorphism of Substances in the European Pharmacopoeia. *Pharm. Acta Helv.* 1991, 66, 16-22.
- Ubbelohde, A. R. *Reactivity of Solids*; de Boer, J. H., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1961; 141-168.
- Mooij, W. T. M.; van Eijck, B. P.; Kroon, J. *Ab Initio Crystal Structure Predictions for Flexible Hydrogen-Bonded Molecules*. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 3500-3505.
- Burger, A.; Ramberger, R. On the Polymorphism of Pharmaceuticals and Other Molecular Crystals. I. Theory of Thermodynamic Rules. *Mikrochim. Acta (Wien)* II 1979, 259-271, II. Applicability of Thermodynamic Rules. *Ibid.* 1979, 273-316.
- Bernstein, J. *Conformational Polymorphism*. *Organic Solid State Chemistry*; Desiraju, G. R., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1987; 471-518.
- Robertson, J. M. The Structure of Resorcinol; A Quantitative X-Ray Investigation. *Proc. R. Soc. London* 1936, A157, 79-99.
- Robertson, J. M.; Ubbelohde, A. R. A New Form of Resorcinol. I. Structure Determination by X-Rays. *Proc. R. Soc. London* 1938; 122-135.
- Gerber, J. J.; Caira, M. R.; Lötter, A. P. Structures of Two Conformational Polymorphs of the Cholesterol-Lowering Drug Probucol. *J. Cryst. Spect. Res.* 1993, 23, 863-869.
- Morris, K. R.; Rodriguez-Hornado; Hydrates, N. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*; Swarbrick, J., Boylan, J., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1993; 7, 393-440.
- Boles, M. O.; Girven, R. J. The Structures of Ampicillin: A Comparison of the Anhydrate and Trihydrate Forms. *Acta Cryst.* 1976, B32, 2279-2284.
- Dunitz, J. D.; Bernstein, J. Disappearing Polymorphs. *Acc. Chem. Res.* 1995, 28, 193-200.
- Guillory, J. K. *Generation of Polymorphs, Hydrates, Solvates, and Amorphous Solids*. *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*; Brittain, H. G., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1999; 183-226.
- Sasaki, K.; Suzuki, H.; Nakagawa, H. *Physicochemical Characterization of Trazodone Hydrochloride Tetrahydrate*. *Chem. Pharm. Bull.* 1993, 41, 325-328.
- Caira, M. R.; Nassimbeni, L. R.; van Oudtshoorn, B. X-Ray Structural Characterization of Anhydrous Metronidazole Benzoate and Metronidazole Benzoate Monohydrate. *J. Pharm. Sci.* 1993, 82, 1006-1009.
- Morris, K. R.; Newman, A. W.; Bugay, D. E.; Ranadive, S. A.; Singh, A. K.; Szyper, M.; Varia, S. A.; Brittain, H. G.; Serajuddin, A. T. M. Characterization of Humidity-Dependent Changes in Crystal Properties of a New HMGC_oA Reductase Inhibitor in Support of Its Dosage Form Development. *Int. J. Pharm.* 1994, 108, 195-206.
- Brittain, H. G. Methods for the Characterization of Polymorphs and Solvates. *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*; Brittain, H. G., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1999; 227-278.
- Threlfall, T. L. *Analysis of Organic Polymorphs*. *Analyst* 1995, 120, 2435-2460.
- Klug, H. P.; Alexander, L. E. *X-ray Diffraction Procedures*, 2nd Ed.; Wiley-Interscience: New York, 1974; 271-311.
- Haleblan, J. K. *Characterization of Habits and Crystal-line Modifications of Solids and Their Pharmaceutical Applications*. *J. Pharm. Sci.* 1975, 64, 1269-1288.
- Wahlstrom, E. E. *Optical Crystallography*, 4th Ed.; John Wiley & Sons: New York, 1969.
- McCrone, W. C. *Fusion Methods in Chemical Microscopy*; Interscience: New York, 1957.
- Kuhnert-Brandstätter, M. *Thermomicroscopy in the Analysis of Pharmaceuticals*; Pergamon Press: Oxford, 1971.
- Giron, D. Applications of Thermal Analysis in the Pharmaceutical Industry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1986, 4, 755-770.
- Van Aerde, Ph.; Remon, J. P.; De Rudder, D.; Van Severen, R.; Braeckman, P. Polymorphic Behavior of Chloroquine Diphosphate. *J. Pharm. Pharmacol.* 1984, 36, 190-191.
- Maury, L.; Rambaud, J.; Pauvert, B.; Lasserre, Y.



- Bergé, G. Physicochemical and Structural Study of Sulfamethazine. *J. Pharm. Sci.* 1985, 74, 422—426.
29. Salole, E. G.; Al-Sarraj, H. Spironolactone Crystal Forms. *Drug Dev. Indust. Pharm.* 1985, 11, 855—864.
30. Stagner, W. C.; Guillory, J. K. Physical Characterization of Solid Iopanoic Acid Forms. *J. Pharm. Sci.* 1979, 68, 1005—1009.
31. Wu, L.-S.; Torosian, G.; Sigvardson, K.; Gerard, C.; Hussain, M. A. Investigation of Moricizine Hydrochloride Polymorphs. *J. Pharm. Sci.* 1994, 83, 1404—1406.
32. Lindenbaum, S.; Rattie, E. S.; Zuber, G. E.; Miller, M. E.; Ravin, L. J. Polymorphism of Auranofin. *Int. J. Pharm.* 1985, 26, 123—132.
33. Brittain, H. G. Spectral Methods for the Characterization of Polymorphs and Solvates. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86, 405—412.
34. Cholerton, T. J.; Hunt, J. H.; Klinkert, G.; Martin-Smith, M. Spectroscopic Studies on Ranitidine—Its Structure and the Influence of Temperature and pH. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1984, 2, 1761—1766.
35. Rocco, W. L.; Morphet, C.; Laughlin, S. M. Solid-state Characterization of Zantone. *Int. J. Pharm.* 1995, 122, 17—25.
36. Grasselli, J. G.; Snavely, M. K.; Bulkin, B. J. Chemical Applications of Raman Spectroscopy; John Wiley & Sons; New York, 1981.
37. Grunenberg, A.; Keil, B.; Henck, J.-O. Polymorphism in Binary Mixtures, as Exemplified by Nimodipine. *Int. J. Pharm.* 1995, 118, 11—21.
38. Bugay, D. E. Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; Theory and Pharmaceutical Applications. *Pharm. Res.* 1993, 10, 317—327.
39. Brittain, H. G.; Morris, K. R.; Bugay, D. E.; Thakur, A. B.; Serajuddin, A. T. M. Solid State Characterization of Fosinopril Sodium Polymorphs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1993, 11, 1063—1069.
40. Suryanarayanan, R.; Wiedmann, T. S. Quantitation of the Relative Amounts of Anhydrous Carbamazepine and Carbamazepine Dihydrate in a Mixture by Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. *Pharm. Res.* 1990, 7, 184—187.
41. Doherty, C.; York, P. Frusemide Crystal Forms; Solid State and Physicochemical Analyses. *Int. J. Pharm.* 1988, 47, 141—155.
42. Grant, D. J. W.; Higuchi, T. Techniques of Chemistry. Solubility Behavior of Organic Compounds; Saunders, W. H., Jr. Ed.; Doctoral Thesis John Wiley and Sons: New York, 1947; 21.
43. Haleblan, J. K.; McCrone, W. C. Pharmaceutical Applications of Polymorphism. *J. Pharm. Sci.* 1969, 58, 911—929.
44. Higuchi, W. I.; Lau, P. K.; Higuchi, T.; Shell, J. W. Polymorphism and Drug Availability; Solubility Relationships in the Methylprednisolone System. *J. Pharm. Sci.* 1963, 52, 150—153.
45. Ghodbane, S.; McCauley, J. A. Study of the Polymorphism of 3-(((3-(2-(7-chloro-2-quinolinyl)-(E)-ethenyl)-phenyl)-((3-dimethylamino-3-oxopropyl)-thio)-methyl)-thio)-propanoic Acid by DSC, TG, XRPD, And Solubility Measurements. *Int. J. Pharm.* 1990, 59, 281—286.
46. Tuladhar, M. D.; Carless, J. E.; Summers, M. P. Thermal Behavior and Dissolution Properties of Phenylbutazone Polymorphs. *J. Pharm. Pharmacol.* 1983, 35, 208—214.
47. Poole, J. W.; Bahal, C. K. Dissolution Behavior and Solubility of Anhydrous and Trihydrate Forms of Ampicillin. *J. Pharm. Sci.* 1968, 57, 1945—1948.
48. Buxton, P. C.; Lynch, I. R.; Roe, J. A. Solid-state Forms of Paroxetine Hydrochloride. *Int. J. Pharm.* 1988, 42, 135—143.
49. Chauvet, A.; Masse, J.; Ribet, J. P.; Bigg, D.; Autin, J. M.; Maurel, J. M.; Patoiseau, J. F.; Jaud, J. Characterization of Polymorphs and Solvates of 3-Amino-1-(m-Trifluoromethylphenyl)-6-Methyl-LH-Pyridazin-4-One. *J. Pharm. Sci.* 1992, 81, 836—841.
50. Jozwiakowski, M. J.; Nguyen, N. A.; Sisco, J. M.; Spancake, C. W. Solubility Behavior of Lamivudine Crystal Forms in Recrystallization Solvents. *J. Pharm. Sci.* 1996, 85, 193—199.

(赵晓群 于垂亮 译)

药物的光解作用

Hanne Hjorth Tønnesen

University of Oslo, Oslo, Norway

引言

许多化合物暴露在光照下会发生降解。一些光敏药物无论是在自然光（尤其是紫外线）还是人工光（如荧光灯）下，都会迅速降解。光线会引起产品理化性质的改变，如观察到沉淀形成、褪色或混浊，黏度降低，或在没有可见的变化状态下主要成分发生光降解等。药物光分解的最明显的结果是失去药效，导致药物制剂治疗无效。尽管不常发生，研究光降解仍很重要，因为在处方储存过程中产生的降解产物可能有毒。这些产物可能在患者使用药物的皮肤或眼部的表面因阳光发生光降解，引起光过敏反应。因此光稳定性实验是产品开发的重要部分，目的是保证在实际应用时产品的质量。

本章涉及药物光敏性的各方面，介绍了已发现的导致药物降解的光化学反应，讨论如辅料等处方因素对产品稳定性的影响，最终阐述了光稳定性研究中要考虑的变量。

药物的光反应性

光化学反应是个复杂的过程，最近十年内，积累了大量关于药物降解途径的数据和报道^[1~3]。光敏性药物分子直接或间接地受到辐射的影响，取决于辐射能量如何转移到药物分子。主要的光敏反应在药物分子本身吸收辐射的时候发生，换言之，当分子的吸收光谱与外界辐射有一定重叠的时候发生。许多药物是白色的，其降解主要取决于材料吸收的紫外辐射量。有色物质吸收光谱中有色区域的光，产品在保质期内发生降解可以通过着色来改变制剂的吸收特点加以解决。产品吸收光谱与影响它的光源光谱的任何重叠，都可能引起光化学变化。另外一种事实是，药物与光源无任何光谱重叠，制剂产品依然发生光降解，这个过程称为光敏化（photosensitization）。由非药物分子吸收并传递能量，导致活性成分降解，吸收能量的成分称为光敏剂（photosensitizer）。光敏剂可以传递吸收的能量，在此过程中可不发生改变，许多情况下其自身也经历降解。因此，制剂中药物的光化学稳定性，不能仅从其吸收光谱或在纯溶剂中的稳定性研究来判断。药物在最终产品中的稳定性也必须进行考察。

在光化学反应中光作为反应物，而不是催化剂。电子自原子的低能量轨道转移到空的高能量轨道，促使分子吸收光能量（光子），产生电子激发的分子。在单态电子自旋是成对的（反向平行），而在三联态电子自旋不配对（平

行）。激发态是比基态更好的电子供体和受体。激发态不稳定，常以热或光的形式释放能量回到基态。许多情况下，激发态导致了高能产物，如自由基或自由基离子。光化学过程常发生两个阶段。初步反应是反应直接导致吸收光子，换言之，涉及激发态形成，反应不依赖于分子活化的温度。初步光化学反应，常紧接着因为初步反应的中介物（如自由基、自由基离子）引起的续发（热力学）反应。这些中介物最终通过“黑暗”反应成为最终稳定产物。一些最终产物可能与仅发生热反应相似（黑暗反应自基础态分子开始），但这种相似性其实是巧合。

药物储存时通常会与空气中氧接触，在血循环和活组织中也会与溶解的氧接触。自激发的药物分子的能量转移，常会导致反应活性氧（reactive oxygen species, ROS）的形成^[4]。I型光敏化反应自电子或光子的转移继续下去，产生的阳离子或中性自由基可能会继续反应。缺氧的情况下，可能会发生二聚合或重组。在氧浓度足够时，氧分子会迅速加合到自由基上，形成过氧游离基（peroxy radical）。过氧游离基反应活性很强，易于自邻近分子获取质子，这个过程常被称为链反应。另一种光敏化机制中，电子自激发态分子转移到基态氧，产生阴离子自由基——过氧化物（superoxide）。过氧化物是一种强氧化剂，对生物系统有很强的毒性。

大部分分子在基态是单体，在过氧化物中氧分子呈三联体。在II型光敏化反应中，能量自激发态分子转移至基态氧产生单体的激发氧，单体激发氧对有机分子反应活性强，通过烯键加成形成过氧化物。

结构与光反应活性的关系很难预测，但是某些结构类型易于发生光降解。举例见表1。烯属的碳-碳双键可以发生顺反异构化，最后环化，芳香乙酸会发生脱羧基反应，氨基化合物发生脱氨基反应，含卤素化合物会脱卤素。药物也可以增敏其自身的降解，或者混合物中的药物发生交叉增敏作用^[5]。许多药物有几种降解途径的报道，这使阐述降解机制复杂化。Greenhill 和 McLelland 编辑了大量的光反应药品的目录^[1]。

表1 发生光反应的化学功能团

羰基
芳香硝基基团
N-氧化物基团
碳-碳双键
卤代芳香基团
氨基 N α 位 C—H



续表

苯基 α 位 C—H
与单线态氧反应
烯烃
多烯类化合物
苯酚
硫化物

在体内具有光化学反应活性的药物在患者体内可能引起光敏性副作用。阳光透过皮肤足以接触到表面毛细血管内循环的药物分子，阳光也可以与眼内累积的药物反应，两种情况下阳光可以将药物转换成毒性降解产物，或者形成 ROS。单态氧和过氧化物对人体组织都是有毒的。皮肤光敏作用可以分为光毒性和光变态反应。光毒性是对皮肤细胞成分的光敏性伤害直接导致皮肤反应。光变态反应是因为免疫系统被激活。光毒性反应可以是氧依赖性的（光促的）或非氧依赖性的（非光促的）。许多时候，光降解产物会在血流中循环，引起内在的器官伤害。然而，要注意到药物和光的结合也可以是有益的，例如，在白癜风、牛皮癣、皮肤癌的治疗和定位药物传输系统的研制中。

光化学反应的速率通常取决于光被系统吸收的速率（如每秒钟吸收的光子数）和光化学反应的效率（如反应的量子收率）。光子吸收率通常与波长无关。含低浓度药物制剂的光化学反应遵循一级动力学^[6]，在高浓度时动力学复杂。大部分光在靠近样品表面被吸收，容器内部的药物分子不受照射的影响，不参与初步反应（内部过滤效应）。如果活性成分浓度高（吸收途径 2），降解动力学可能遵循零级动力学，这种情况下，基本所有的光被药物吸收，限速因素是光强度。然而重叠的积分决定反应速率，若重叠积分很小，即使样品中含有大量的吸收源，反应仍呈现一级动力学。在光敏化反应中，药物消失的速率取决于药物和光敏剂的浓度，换言之，降解过程遵循二级动力学。在固体状态，很难用反应的级数来描述光降解反应。光化学反应发生在产品表面，总浓度的改变与照射时间的关系不一定遵循某个反应级数模型^[7]。

产品处方对药物光稳定性的影响

大部分光化学反应受到介质的影响，如既包括辅料，又包括处方的类型^[8]。处方因素对产品光稳定性的影响举例如表 2 所示。静脉输注产品中的药品常是稀溶液的形式，然而皮肤制剂中活性药物状态介于溶液和固态之间。注射液表面积/体积大，药物浓度低，使大量光易接触药物分子。固态状态下，光渗透的深度取决于样品表面的特点，如胶囊和片剂具有不同的光散射特点和不同的表面积/体积。

表 2 影响药物光稳定性的处方因素

溶液剂	固体制剂	其他
药物浓度	晶体改变	环糊精（类型）
溶剂系统	微粒粒径	脂质体（类型，电荷）
潜溶剂	离子表面（多孔、光滑）	胶束（类型，电荷）
表面活性剂		乳化剂
pH	颜色	分配系数
氧气浓度	包衣	
缓冲盐（类型，浓度）	粉末层厚度	
离子强度	容器	
金属离子		
螯合剂		
抗氧剂		
防腐剂		
甜味剂		
等渗调节剂		
着色剂		
容器		

为了提高微溶化合物的溶解度或改变药物分子的稳定性，常在制剂中加入潜溶剂（乙醇或多元醇和表面活性剂）。潜溶剂会改变极性，或改变介质的黏度，这些可影响化合物的光化学活性。溶解度的提高会改变样品的吸光率；聚集粒子的分散会提高光对分散的药物分子的影响；表面活性剂形成胶束会与药物分子结合，引起药物摩尔吸收度的改变，或因为微环境效应引起反应活性的改变。潜溶剂和表面活性剂可增强产品光稳定性，也可能促进光降解作用，如其分别对苯巴比妥和咪喃西林的影响^[9,10]。

对于许多药品，光降解过程高度依赖于分子的离子形式（如环丙沙星、咪达唑仑和氯唑）^[11~13]。抗疟药甲氟喹的二价离子形式几乎不会光降解，而其一价离子和中性形式很容易发生光降解^[14]。氧浓度在这个过程中很重要。在光照时，以氮冲洗甲氟喹样品会很大程度上提高降解速率。除氧导致不稳定在其他药物也有出现，如硝西泮^[15]。对于氧敏感化合物，通常可以通过高速流动或用惰性气体顶空来使样品稳定。然而，值得注意的是氧参与反应只是作为催化剂，即使痕量的氧也可以使产品不稳定。有报道增大离子强度对某些药物具有光稳定性作用，机制是在反应分子周围形成溶剂化离子膜^[16]，这种效应在甲氟喹中没有观察到^[14]。另外，缓冲液中磷酸离子浓度也会提高降解速率，已知磷酸离子是通过促进自反应属激发态的质子传递^[17]来影响化合物的光化学特征（如酪氨酸）。不同类型的缓冲盐对光降解过程发挥不同作用，如对药物柔红霉素^[18]。缓冲盐（如柠檬酸盐）通过与存在的其他化合物形成复合物，也能改变制剂的光吸收特点，形成的产物在可



见光区域吸收不同。

很多时候,降解速率高度依赖于痕量的金属,因此许多制剂中使用了不同的螯合剂和抗氧化剂,水溶液系统常用酸性亚硫酸盐和 EDTA。许多药物对酸性亚硫酸盐呈现高活性,有报道其对肾上腺素制剂的光稳定性具有显著作用^[19]。Fe(Ⅲ)-EDTA 螯合物被过氧化物迅速降解,EDTA 在离子催化系统中不能抑制药物降解,Haber-Weiss 反应起到重要作用。抗氧剂和螯合剂对药物稳定性的影响在使用前一定要谨慎评价。其他辅料,如张力调节剂、着色剂(见下)和甜味剂,能进一步与常用的稳定剂反应或者影响药物的光反应活性^[20~23]。

使用吸收光谱重叠的辅料的光防护可以稳定不同的药物和制剂。采用黄色化合物姜黄素于软明胶胶囊壳可以对药物起到保护作用,如硝苯地平、氯霉素、咪唑啉和氯硝西泮^[24]。在片剂、溶液和皮肤制剂中加入着色剂会进一步稳定药物^[25]。然而,着色剂或颜料的混合物也可以发生催化衰退^[26]或通过自由基形成导致制剂中的其他成分降解^[27,28]。

固体状态的光降解只在样品表面发生。降解速率取决于影响光渗透深度的因素,换言之,指吸收的改变和表面的反射(如粒径、晶体改变、颜色、粉末厚度和微粒的包衣或剂型)。有的药物依赖于其多晶型改变而呈现不同降解速率,如甲氟喹、氯喹、卡马西本和咪唑啉^[29~32]。

在溶液和固体状态中,都可以通过合适载体的络合作用改变药物的光反应活性。甲硝唑与尿酸钠形成复合物后对光照敏感性降低^[33]。吩噻嗪等各种药物被环糊精包合后,光降解的程度会降低^[34~36],不同种类的环糊精之间的稳定效应明显不同。脂质体或混合脂质体和环糊精都能提高药物光稳定性^[37,38]。

常用的保护光敏药物的方法,是将制剂放置在保护性市售包装内,或者彩色、琥珀色无特殊防护的容器内。储存和使用,可以除去保护性包装。透明玻璃或塑料材质的无防护容器,对光照的防护功能很小。琥珀色容器的保护作用较好,但是其厚度、化学质地(塑性)和着色程度不同会影响光防护作用。采用琥珀色玻璃容器作为唯一的光防护措施对于高度光不稳定的药物(如吗多明^[39])是不够的。对于肾上腺素、异丙肾上腺素和去甲肾上腺素,仅棕色瓶的保护作用不够^[40]。容器引起稳定性下降,原因是其会释放碱或者使玻璃呈现颜色必需的痕量重金属而造成药物不稳定。

光稳定性研究

在制剂研究过程中,对于药物的光稳定信息获得越来越好^[41]。药品的光化学和光物理特征,对于产品的处置、包装和加标记都很重要。全面评价光敏感性的一种方法是早期报道的光稳定评价^[42]。在 ICH 光稳定性指南中阐述了第一次申请时递交的新药和产品评价草案,该指南自 1998 年 1 月开始执行^[43]。指南中指出,光稳定评价应该是应

测试的整个部分,尽管其提出的测试方法操作合理简单,仍然有些变量在光稳定性研究中需要仔细控制。近有综述讨论了关于应用现行的指南中的相关问题^[44],需要考虑的重要因素包括光源、光照水平、校准和样品包装规格^[45~48]。

在药物和药品稳定性研究中可以采用各种光照光源。采用的光源应该与产品实际应用中暴露的光源的光谱分布具有可比性。太阳到达地球的辐射能量段包括:UVB(290~320 nm)、UVA(320~400 nm)和可见光(VIS,400~700 nm)波段。然而,要预测产品在保质期内暴露的光照的 UV 和 VIS 的准确量是很难的。因此光照条件应该提供“最差状态”的状态。ICH 指南提供了两种选择光源的方式。选择 1 是暴露在户外光线或窗户玻璃滤过的日光下。大部分情况下,能提供玻璃滤过日光的光源(根据 ISO10977 为 ID65)是合适的。选择 1 可以采用结合 UV 和 VIS 输出的荧光灯,或采用氙或金属卤灯。要模拟户外调节,用窗户玻璃滤过结合能产生显著低于 320nm 照射的光源(如氙和金属卤灯、近 UV 荧光灯管)。ICH 指南中的选择 2 要暴露于户内荧光灯(冷白光)。在保质期内,产品可能暴露于自然光透过窗户玻璃后和人工光(如荧光灯管光线)的混合物下。因此 UV 源加入选择 2 中,以弥补接触样品的自然光光谱区,根据这个选择,测试条件比户内荧光灯强烈,但是不足以模拟透过窗玻璃的日光。

ICH 指南建议在 UV 区域(320~400nm)彻底暴露 200 (W·h)/m²,在 VIS 区域内(400~700nm)暴露 1.2Mlx·h。对于模拟窗户玻璃滤过日光的普通光源,在 UV 区总辐射度为 200 (W·h)/m²,在可见区域大约为 0.45Mlx·h。当按照选择 1 中选择灯时,采用 1.2Mlx·h 做最终标准的测试,可能会超出 200 (W·h)/m² 的要求的 2.5~3 倍,除非采取预防措施^[44]。在这种情况下,选择 2 比较容易操作,因为在达到要求的 UV 暴露值时可以关闭 UV 灯。

ICH 指南没有给出选择 1 或 2 的指南。尽管两种选择科学上不等价,但在用于证实实验时可以看做等价的。然而在加标签前,把这些结果与从其他测试中已获得的信息结合起来考虑是相当重要的。

ICH 指南全面的阐述很详细,但是没有指出光照水平。选择的光照水平必须足以促进加速实验,而又不引起不希望的温度变化。在显著不同光照水平下操作的实验不能类比,除非已经建立了相关关系。为了保持光照强度恒定,光源和样品表面的距离应该确定。样品在测试管内,所以照射在样品表面的光照也是变化的。因此要测定穿过样品管的 UV 和可见水平的光照量,以保证样品放置的点具有要求的光照量。

即使按照生产商注明的间隔来变换灯,仍然要校准光源,周期检测其照射量,以保证获得目的曝光值。对于没有插入传感器的仪器,可以手工进行校准。ICH 指南建议采用有刻度的辐射计或验证的光化线强度测定法系统来监测在 UV 区曝光值,用有刻度的照度计来测定在可见区域

全面的照度。ICH 指南也没有给出照射光源的光谱分布信息。UV 过滤器辐射计是宽谱带仪,用来测定在 UV 区域入射辐射值。光学滤光片限制某个谱带的光谱响应值(如 UVB 和 UVA),但是因为不同生产商生产的滤光片和辐射计没有国际标准,所以会测量辐射能的不同部分。照度计和人眼感知一样测量光线,换言之,它具有光适应的反应曲线。人眼的屈光性敏感性范围是 380~780nm,在 555nm 处灵敏度最高。辐射计和照度计在实际波长范围内都没有恒定的光谱敏感性(如不同波长的相对权重不恒定)。这些装置应该在规律间隔内由生产商进行校准。如果仪表被认为是标准的,则可以用于测定射出光线照射样品的面积的平等性、随时间的总输出值的平等性。然而,其不能用来给出射出光线的绝对测定值,或者比较光源间的射出光线,除非其针对每个光源进行了校准^[44]。ICH 指南提出奎宁感光测定法作为在 UV 区域校准辐射计的选择之一。因此可以通过已知的光化学效率反应来测定总射出光线^[47,49]。

药物样品在光分解考察中曝光时,可以将样品放置在透明或琥珀色玻璃、塑料制品、市售容器或培养皿内。容器的光谱透过率会影响实验结果。例如,透明玻璃内的光照度大于琥珀色、蓝色或绿色玻璃,光谱分布也不同。其他考虑因素包括样品容器的方向(竖直、倒置或向侧面的)、容器材料的厚度、容器的面积/体积(质量)。ICH 指南建议对于固体形式的药品,样品的厚度不超过 3mm。片剂或胶囊等制剂应该以单层分布。采用保护性的容器主要的缺点是会明显提高温度。因此,真实样品旁边要放置避免光照对照样品。在 ICH 指南中,为了光稳定性评价不建议在曝光时搅拌或振摇样品。

参考文献

- Greenhill, J. V.; McLelland, M. A. Photodecomposition of Drugs. *Prog. Med. Chem.* 1990, 27, 51—121.
- Greenhill, J. V. Is the Photodecomposition of Drugs Predictable? *Photostability of Drugs and Drug Formulations*; Tønnesen, H. H., Ed.; Taylor & Francis: London, 1996; 83—110.
- Albini, A.; Fasani, E. Photochemistry of Drugs; An Overview and Practical Problems. *Drugs. Photochemistry and Photostability*; Albini, A., Fasani, E., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1998; 1—74.
- Moore, D. E. Photophysical and Photochemical Aspects of Drug Stability. *Photostability of Drugs and Drug Formulations*; Tønnesen, H. H., Ed.; Taylor & Francis: London, 1996; 9—38.
- Moore, D. E.; Mallesch, J. L. Photochemical Interaction between Triamterene and Hydrochlorothiazide. *Int. J. Pharm.* 1991, 76, 187—190.
- Tønnesen, H. H. Photochemical Degradation of Components in Drug Formulations. I. An Approach to the Standardization of Degradation Studies. *Pharmazie* 1991, 46, 263—265.
- Sande, S. A. Mathematical Models for Studies of Photochemical Reactions. *Photostability of Drugs and Drug Formulations*; Tønnesen, H. H., Ed.; Taylor & Francis: London, 1996; 323—340.
- Kerker, R. Untersuchungen zur Photostabilität von Nifedipin, Glucocorticoiden, Mosidomin und Ihren Zubereitungen, München, 1991, Dissertation.
- Shahjahan, M.; Enever, R. P. Photolability of Nitrofurazone in Aqueous Solution. II. Kinetic Studies. *Int. J. Pharm.* 1996, 143, 83—92.
- Asker, A. F.; Islam, M. S. Effect of Sodium Thiosulphate on the Photolysis of Phenobarbital; Evidence of Complex Formation. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 1994, 48, 205—210.
- Torniaainen, K.; Tammilehto, S.; Ulvi, V. The Effect of pH, Buffer-Type and Drug Concentration on the Photodegradation of Ciprofloxacin. *Int. J. Pharm.* 1996, 132, 53—61.
- Andresin, R.; Tammilehto, S. Photochemical Decomposition of Midazolam. IV. Study of pH-Dependent Stability by High-Performance Liquid Chromatography. *Int. J. Pharm.* 1995, 123, 229—235.
- Nord, K.; Orsteen, A.-L.; Karlsen, J.; Tønnesen, H. H. Photoreactivity of Biologically Active Compounds. X. Photoreactivity of Chloroquine in Aqueous Solution. *Pharmazie* 1997, 52, 598—603.
- Tønnesen, H. H. Photoreactivity of Biologically Active Compounds. XV. Photochemical Behaviour of Mefloquine in Aqueous Solution. *Pharmazie* 1999, 54, 590—594.
- Cornelissen, P. J. G. Beijersbergen van Henegouwen, G. M. J. Photochemical Decomposition of 1, 4-Benzodiazepines. Nitrazepam. *Photochem. Photobiol.* 1979, 30, 337—341.
- Chinnian, D.; Asker, A. F. Photostability Profiles of Minoxidil Solutions. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 1996, 50, 94—98.
- Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy; Plenum Press: New York, 1983; 360.
- Islam, M. S.; Asker, A. F. Photoprotection of Daunorubicin Hydrochloride with Sodium Sulfite. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 1995, 49, 122—126.
- Brustugun, J.; Tønnesen, H. H.; Klem, W.; Kjøniksen, I. Photodestabilization of Epinephrine by Sodium Metabisulfite. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 2000, 50, 136—143.
- Asker, A. F.; Canady, D. Influence of Certain Additives on the Photostabilizing Effect of Dimethylsulfoxide for

- Sodium Nitroprusside Solutions. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1984, 10, 1025—1039.
21. Asker, A. F.; Harris, C. W. Influence of Certain Additives on the Photostability of Physostigmine Sulfate Solutions. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1988, 14, 733—746.
 22. Ho, A. H. L.; Puri, A.; Sugden, J. K. Effect of Sweetening Agents on the Light Stability of Aqueous Solutions of L-Ascorbic Acid. *Int. J. Pharm.* 1994, 107, 199—203.
 23. Asker, A. F.; Colbert, D. Y. Influence of Certain Additives on the Photostabilizing Effect of Uric Acid for Solutions of FD & C Blue No. 2. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1982, 8, 759—774.
 24. Tønnesen, H. H.; Karlsen, J. Studies on Curcumin and Curcuminoids. X. The Use of Curcumin as a Formulation Aid to Protect Light-Sensitive Drugs in Soft Gelatin Capsules. *Int. J. Pharm.* 1987, 38, 247—249.
 25. Thoma, K. Photodecomposition and Stabilization of Compounds in Dosage Forms. *Photostability of Drugs and Drug Formulations*; Tønnesen, H. H., Ed.; Taylor & Francis: London, 1996; 111—140.
 26. Kuramoto, N.; Kitao, T. Mechanism of the Photofading of Dye. Contribution of Singlet Oxygen in the Catalytic Fading of Anthraquinone Dye Mixtures. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1980, 30, 129—135.
 27. Skowronski, T. A.; Rabek, J. F.; Rånby, B. The Role of Commercial Pigments in the Photodegradation of Poly (Vinyl Chloride) (PVC). *Polym. Degrad. Stab.* 1984, 8, 37—53.
 28. Sidhu, D. S.; Sugden, J. K. Effect of Food Dyes on the Photostability of Aqueous Solutions of L-Ascorbic Acid. *Int. J. Pharm.* 1992, 83, 263—266.
 29. Nord, K.; Andersen, H.; Tønnesen, H. H. Photoreactivity of Biologically Active Compounds. XII. Photostability of Polymorphic Modifications of Chloroquine Diphosphate. *Drug Stab.* 1997, 1, 243—248.
 30. Tønnesen, H. H.; Skrede, G.; Martinsen, B. K. Photoreactivity of Biologically Active Compounds. XIII. Photostability of Mefloquine Hydrochloride in the Solid State. *Drug Stab.* 1997, 1, 249—253.
 31. Matsuda, Y.; Akazawa, R.; Teraoka, R.; Otsuka, M. Pharmaceutical Evaluation of Carbamazepine Modifications: Comparative Study for Photostability of Carbamazepine Polymorphs by Using Fourier-Transformed Reflection-Absorption Infrared Spectroscopy and Colorimetric Measurement. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994, 46, 162—167.
 32. de Villiers, M. M.; van der Watt, J. G.; Lötter, A. P. Kinetic Study of the Solid State Photolytic Degradation of Two Polymorphic Forms of Furosemide. *Int. J. Pharm.* 1992, 88, 275—283.
 33. Habib, M. J.; Asker, A. F. Complex Formation Between Metronidazole and Sodium Urate: Effect on Photodegradation of Metronidazole. *Pharm. Res.* 1989, 6, 58—61.
 34. Lutka, A. Effect of Cyclodextrin Complexation on Aqueous Solubility and Photostability of Phenothiazine. *Pharmazie* 2000, 55, 120—123.
 35. Mielcarek, J. Photochemical Stability of the Inclusion Complexes of Nicardipine with α -, γ -Cyclodextrin, Methyl- β -Cyclodextrin and Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin in the Solid State and in Solution. *Pharmazie* 1996, 51, 477—479.
 36. Thoma, K.; Kübler, N. Einfluss von Hilfsstoffen auf die Photozersetzung von Arzneistoffen. *Pharmazie* 1997, 52, 122—129.
 37. Habib, M. J.; Asker, A. F. Photostabilization of Riboflavin by Incorporation into Liposomes. *J. Parent. Sci. Technol.* 1991, 45, 124—127.
 38. Loukas, Y. L.; Jayasekera, P.; Gregoriadis, G. Novel Liposome-Based Multicomponent System for the Protection of Photolabile Agents. *Int. J. Pharm.* 1995, 117, 85—94.
 39. Thoma, K.; Kübler, N. Einfluss der Wellenlänge auf die Photozersetzung von Arzneistoffen. *Pharmazie* 1996, 51, 660—664.
 40. Wollmann, H.; Grünert, R. Einfluss des Sichtbaren Lichtes auf die Haltbarkeit von Isoprenalin-, Epinephrin- und Levaterenollösungen in Unterschiedlichen Behältnissen. *Pharmazie* 1984, 39, 161—163.
 41. Merrifield, D. R.; Carter, P. L.; Clapham, D.; Sanderson, F. D. Addressing the Problem of Light Instability During Formulation Development. *Photostability of Drugs and Drug Formulations*; Tønnesen, H. H., Ed.; Taylor & Francis: London, 1996; 141—154.
 42. Tønnesen, H. H.; Kristensen, S.; Nord, K. In Vitro Screening of the Photoreactivity of Antimalarials: A Test Case. *Photostability of Drugs and Drug Formulations*; Tønnesen, H. H., Ed.; Taylor & Francis: London, 1996; 267—285.
 43. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products. *Federal Register* 1997, 62, 27115—27122.
 44. Tønnesen, H. H. The ICH Photostability Guideline. A Discussion of Experimental Conditions. *Pharmaceutical Photostability and Stabilization Technology*; Thoma, K., Piechocki, J. T., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, In press.
 45. Piechocki, J. T. Selecting the Right Source for Pharma-



Y

- ceutical Photostability Testing. *Drugs. Photochemistry and Photostability*; Albini, A., Fasani, E., Eds.; The Royal Society of Chemistry; Cambridge, UK, 1998; 247—271.
46. Boxhammer, J.; Willwoldt, C. Design and Validation Characterisites of Environmental Chambers for Photostability Testing. *Drugs. Photochemistry and Photostability*; Albini, A., Fasani, E., Eds.; The Royal Society of Chemistry; Cambridge, UK, 1998; 272—287.
47. Favaro, G. Actinometry: Concepts and Experiments. *Drugs. Photochemistry and Photostability*; Albini, A., Fasani, E., Eds.; The Royal Society of Chemistry; Cambridge, UK, 1998; 295—304.
48. Moore, D. E. Standardization of Photodegradation Studies and Kinetic Treatment of Photochemical Reactions. *Photostability of Drugs and Drug Formulations*; Tønnesen, H. H. Ed.; Taylor & Francis; London, 1996; 63—82.
49. Baertschi, S. W. Commentary on the Quinine Actinometry System Described in the ICH Draft Guideline on Photostability Testing of New Drug Substances and Products. *Drug Stab.* 1997, 1, 193—195.

(陈 卫 译)

药物的剂量确定：给药方案和剂量应答

Chyung S. Cook

Aziz S. Karim

Pharmacia Corporation, Skokie, Illinois, U. S. A.

引言

药物是因为其药理作用才被服用。然而，在一些情况下，药物疗法包含出现副作用的风险，每种药物在使用时都伴随着固有的不同风险。因此，医师的目的就是通过选择适当的给药剂量、给药途径和给药频率来实现药物的最佳给药方案，以达到药物的最大药理功效，同时副作用最小。

在大多数临床情况下，药物要么在一定时间间隔下重复给药，要么就是连续输注给药以维持稳态血药浓度在该药已知的治疗浓度范围内。对于半衰期长的药物，在治疗起始阶段需要一个负荷剂量以快速达到靶浓度。这些维持剂量和负荷剂量与给药频率一样，都可以用药动学原理来计算确定。

剂量的确定

1. 维持剂量

为普通患者选择适当维持剂量和给药频率的一般规则如下：要想维持靶浓度在稳态，药物的给药速率必须等于药物的消除速率。这可利用清除率概念用下述方程来表示：

$$\text{给药速率} = (CLF) \times c_{ss} \quad (1)$$

式中：CL 为清除率； c_{ss} 为药物的稳态浓度；F 为是药物进入血液循环的分数。因此，如果 CL、F 和 c_{ss} 已知，就可以计算药物的合适剂量和给药间隔。

例如，茶碱，其清除率为 0.65 mL/(min/kg) (60kg 男性为 2.34 L/h)，在健康不吸烟的哮喘患者中的半衰期为 9h，有效血浆浓度为 5~15 mg/L。因为是静脉输注给药，其生物利用度 F 为 1。如果目标稳态血浆浓度为 10 mg/L，则一个 60kg 男性的静脉输注速率 = 2.34 L/h × 10 mg/L = 23.4 mg/h。

如果药物不是连续输注而是单次剂量给药（如静脉注射或口服给药），则血浆浓度会在峰值（ c_{max} ）和谷值（ c_{min} ）之间有较大的波动。如果药物的吸收和分布非常快，则血浆浓度在峰值和谷值之间的波动几乎由消除半衰期来控制。当给药间隔等于药物的半衰期时， c_{max}/c_{min} 的值为 2，这通常是可容许的，只要药物的药理效应与血浆浓度直接相关即可。

再用茶碱为例，如果目标平均血浆浓度为 10 mg/L，上述例子计算出来的剂量为 23.4 mg/h。因而，要维持该平均

血浆浓度，则单次静脉注射剂量可设定为 140 mg/6h（每日 4 次）、187 mg/8h（每日 3 次）、280 mg/12h（每日两次）或 560 mg 每天一次。非输注给药方案的平均血浆浓度可用下式来确定：

$$\text{平均血浆浓度} = AUC/\tau \quad (2)$$

式中：AUC 为血药浓度-时间曲线下的面积； τ 为给药间隔。

虽然上述这些给药方案都为了达到同一目标——平均血浆浓度，但它们的稳态峰浓度（ $c_{ss,max}$ ）和稳态谷浓度（ $c_{ss,min}$ ）会有显著的不同。对于一给定剂量， $c_{ss,max}$ 和 $c_{ss,min}$ 的值可以用下述式（3）和式（4）计算。同样的，也可以用这些公式估算达到目标浓度最大值和最小值所需的剂量。

$$c_{ss,max} = \frac{F \times Dose \times e^{-KT_{max}}}{V_{ss} (1 - e^{-K\tau})} \quad (3)$$

$$c_{ss,min} = \frac{K_a \times F \times Dose \times e^{-K\tau}}{V_{ss} (K_a - K) (1 - e^{-K\tau})} \quad (4)$$

式中：K 为消除速率常数（等于 0.693 除以临床相关的半衰期）； K_a 为吸收速率常数； T_{max} 为达到 c_{max} 所需时间； V_{ss} 为稳态分布容积。

静脉注射给药时， T_{max} 为 0，则式（3）中 $e^{-KT_{max}}$ 项为 1，式（4）中 $K_a/(K_a - K)$ 项也为 1。 $e^{-K\tau}$ 为给药间隔末期在体内的最后一剂的残余分数。

对于茶碱（60kg 男性 V_{ss} = 30 L， K = 0.077/h， τ = 6h、8h、12h 或 24h），静脉注射给药的 c_{max} 、 c_{min} 和 c_{max}/c_{min} 计算值如下：

给药方案	$c_{max}/(\text{mg/L})$	$c_{min}/(\text{mg/L})$	c_{max}/c_{min}
140mg qid	12.6	8.0	1.6
187mg tid	13.6	7.3	1.9
280mg bid	15.5	6.1	2.5
560mg qid	22.2	3.5	6.3

注：qid 指一天 4 次；bid 指一天 2 次；tid 指一天 3 次。

因为茶碱的治疗指数相对较狭窄，人们期望确定其剂量以使稳态峰浓度和稳态谷浓度落在治疗浓度范围内（5~15 mg/L）。因此，每日两次，每次 280 mg 的给药方案是比较方便的，也足以使 c_{max} 和 c_{min} 落在治疗浓度范围内。

如上表中所示，给药越频繁，药物的血浆峰浓度和谷浓度比值就越小。这些现象也被计算机模拟的血浆浓度-时间曲线所证明（图 1）。如果给药间隔等于或小于半衰期，甚至对于治疗窗狭窄的药物，其浓度在 c_{max} 和 c_{min} 之间的波

动通常也是可接受的。如果给药间隔大于半衰期，药物浓度的波动会较大，这是治疗窗狭窄药物所不期望的。然而，如果药物的半衰期非常短，则在每个半衰期给药是不实际

的。因此，常常用不同的剂型给药（例如，延长释放或控制释放）。对于半衰期长的药物（大于12h），则可以每天给药一次或两次来维持适当的治疗浓度水平。

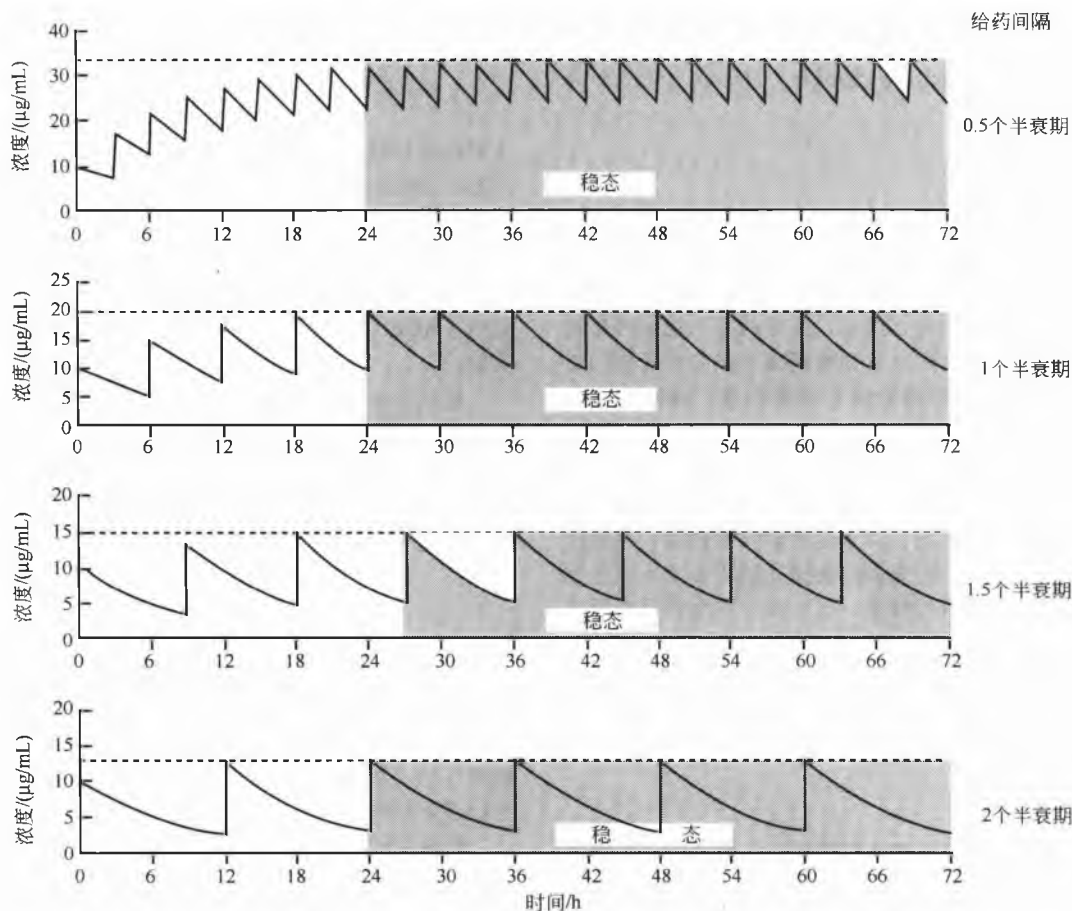


图1 以给药间隔为1、1.5、2和3个半衰期重复给药后的模拟血浆浓度-时间曲线。不管给药间隔多长，药物浓度在第4个（24h）和第5个（30h）半衰期间达到稳态水平。给药间隔为0.5个、1个、1.5个和2个半衰期的累积因子（R）为3.4、2、1.6和1.3

在静脉给药后（双室模型），紧接着多剂量口服遵从双指数药动学的药物，对 $C_{ss,max}$ 和 $C_{ss,min}$ 的估算牵涉到一系列复杂的吸收和分布的指数常数，如式（5）和式（6）所示：

$$C_{ss,max} = \frac{F \times Dose (K_{21} - \alpha) e^{-\alpha T_{max}}}{V_{ss} (\beta - \alpha) (1 - e^{-\alpha T})} + \frac{F \times Dose (K_{21} - \beta) e^{-\beta T_{max}}}{V_{ss} (\alpha - \beta) (1 - e^{-\beta T})} \quad (5)$$

$$C_{ss,min} = \frac{K_a \times F \times Dose (K_{21} - \alpha) e^{-\alpha T}}{V_{ss} (K_a - \alpha) (\beta - \alpha) (1 - e^{-\alpha T})} + \frac{K_a \times F \times Dose (K_{21} - \beta) e^{-\beta T}}{V_{ss} (K_a - \beta) (\alpha - \beta) (1 - e^{-\beta T})} \quad (6)$$

式中： α 和 β 分别为分布相和消除相的速率常数； K_{21} 为从组织到血浆的转运速率常数。

在单室模型中，单次静脉给药或快速口服吸收的 T_{max} 为0，而式（5）中 $e^{-\alpha T_{max}}$ 和 $e^{-\beta T_{max}}$ 两项都变为1。式（6）中 $K_a/(K_a - \alpha)$ 和 $K_a/(K_a - \beta)$ 两项也变为1。

如果药物的吸收和分布非常迅速，则这几项都可以简单忽略不计，甚至对于双室模型，通过略去上述方程（3）分子中的 $e^{-KT_{max}}$ 项，可以很容易地预测出药物的最大稳态浓度。因为所做的这些近似，用这个方程预测的最大浓度将比实测值大。

正如上述所讨论的，可以单独用药动学参数来设计给药方案。然而，在一些情况下，出于药效学的考虑，使给药方案的筛选偏离了这个原则。如果药理学半衰期与药动学半衰期有很大的不同，则应该使用药效学半衰期（来代替药动学半衰期）。例如，阿司匹林会迅速水解成水杨酸，但其抗血小板活性的半衰期为数天。因此，每天少量的阿司匹林就是可达到所需药理响应的一个好的给药方案。另一个例外的情况是那些相对无毒性的药物，纵使其药理活性与血浆浓度直接相关（即治疗指数大的药物）。在这种情况下，可给予高剂量的药物，这样其给药间隔就可以大大长于消除半衰期。青霉素G的半衰期小于1h，但其可每6h

或 12h 给予一次非常大的剂量。

如果药物的吸收比较慢，并且表观吸收半衰期大大长于消除半衰期，则可基于吸收相的表观半衰期设计给药方案。改变处方以延长短效药物吸收的持续时间是相对普遍的方法。硝酸甘油的消除半衰期大约是 2min。然而，硝酸甘油在经皮给药剂型中是慢慢释放的，其治疗血浆浓度水平可以维持 24h。

关于给药方案的另一个问题是，需要多久改变一次剂

量和改变多少剂量？这通常可用简单的药动力学原理来确定。剂量的改变不会多于 50%，也不会多于每 3~4 个半衰期改变一次。不管药物的半衰期和给药频率是多少，如果消除速率常数小于吸收速率常数，通常需要 3 个半衰期的时间来达到 87.5% 的稳态血浆浓度水平（图 2）。然而，如果消除速率常数比吸收速率常数大很多的话，则达到稳态的时间将取决于吸收速率常数而不是消除速率常数。

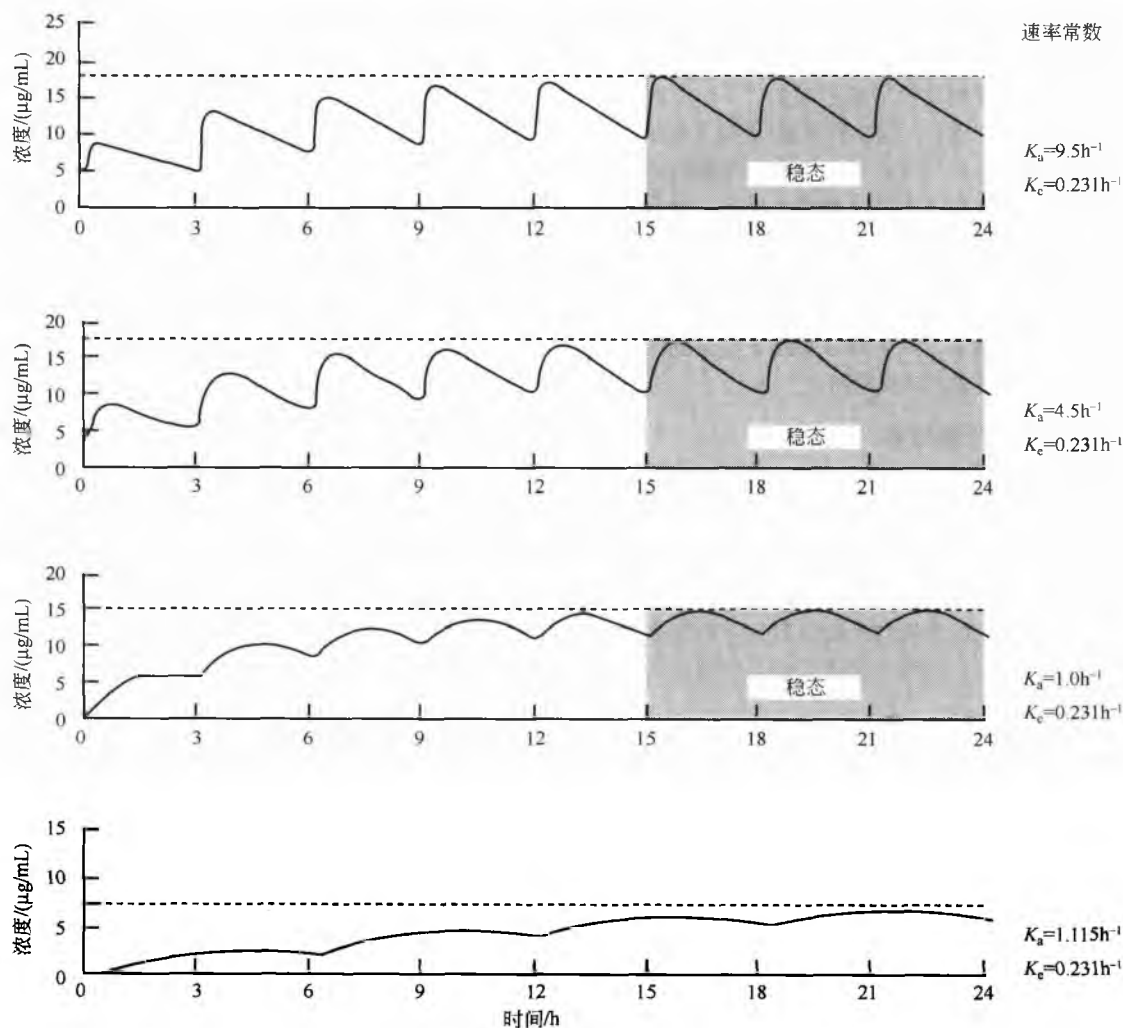


图 2 计算机模拟的血浆浓度-时间曲线。显示吸收速率对达到稳态血浆浓度所需时间的影响。当吸收速率高于消除速率时，达到稳态浓度的时间取决于消除速率（前三条曲线）。当吸收速率低于消除速率时，达到稳态浓度的时间取决于吸收速率（最后一条曲线）

2. 负荷剂量

负荷剂量的适当大小可按式（7）计算：

$$\text{负荷剂量} = \text{目标血浆浓度} \times V_{ss} / F \quad (7)$$

要达到稳态血浆浓度，需要大约 4 个消除半衰期的时间。如果半衰期很长，并且在危及生命的治疗情况下需要药物立即起效，则单个或多少个的负荷剂量往往是不可避免

的。例如，利多卡因的半衰期大于 1h。然而，一个心律不齐的患者在发生心肌梗死后，是不可能通过静脉输注来花 4~6h 的时间等待药物达到治疗浓度水平。这时，在冠状动脉用利多卡因给予一个负荷剂量是标准的疗法。

对于口服给药，负荷剂量通常两倍于单次剂量。这是基于当药物按每个半衰期的间隔给药时，累积因子为 2 的药动力学原理。然而，负荷剂量的使用是需要慎重的，特别

是那些治疗窗狭窄的药物,因为那些敏感的个体可能会因此而暴露于中毒浓度下。此外,对于半衰期长的药物,将大量的负荷剂量从体内消除需要很长的时间。

剂量-(或浓度-) 应答关系

药物主要是由血液从吸收部位运送到靶器官/组织或血液组分中与受体相互作用而产生效应。结果对于多数药物来说,在药物的血浆或血清浓度与其临床功效和毒性之间存在不同的关系类型。为了在药物的生物利用度输入(血浆浓度)和药理效应输出(应答)之间确立可靠的数学关系,人们做了很多直接指向这方面的努力^[1~3]。虽然这种关系还远远未能被完全理解,但这种剂量-应答关系在做治疗决策时是很重要的,并且可合理地以血浆浓度为标记对许多药物疗法的理想给药方案慎重地进行计划,特别是当药理效应可以容易地测定时(如血压)。剂量-应答关系通常取决于血浆浓度是否与应答直接相关和药物与其受体的相互作用方式是否可逆。如果在血浆/血清浓度与药理效应之间没有明显的相互联系,或者药理效应不容易进行测定时,采用错误尝试法可能会比较实际。

1. 直接可逆的药理应答

直接快速可逆的药理应答的概念意味着应答强度与药物在作用部位的浓度是直接关联的。在这一范畴内,我们将讨论两种模型(药效学模型和药动学-药效学模型)。

在药效学模型中,不管其药动学模型是单室的还是多室的,药物在受体位点的浓度与药物在血浆中的浓度是成比例的,并且在给药后,药物和受体的相互作用是直接快速可逆的。

血浆浓度(c)和药理应答强度(I)常常遵循名为希尔方程(Hill equation)的经验关系式:

$$I = \frac{I_{\max} c^n}{(c_{50}^n + c^n)} \quad (8)$$

式中: I_{\max} 为由药物引起的最大效应; c_{50} 为产生50%最大效应时的浓度。与方程(8)相关的两个例子是 d -筒箭毒碱对肌力的体内效应和人体中托卡胺的血浆浓度-抗心律不齐效应。

另一个常用的浓度-应答经验关系式是药理应答与剂量、血浆浓度或体内药物浓度的对数的S形曲线。这条曲线常常表现出极好的线性,线性范围至少从可达到的最大应答强度的20%到80%,这也是药物疗法中人们感兴趣的一个区域。在应答与血浆浓度对数之间的这种表现线性已在许多药物中得到证明,如茶碱和普萘洛尔。将应答与血浆浓度对数关联,而不是与剂量的对数关联,降低了由于患者之间吸收、代谢和排泄的差别所引起的应答的变异性。

在药动学-药效学模型中,药物浓度在效应部位是未知的,或者由于未知的药物效应而无法进行估计。如果药理应答与接收了大量药物的周边室(而不是中央室)相关联,

以应答对周边室中的计算药物浓度(不是血浆浓度)作图时也可得到一条线性、对数-线性或S形的关系曲线。在人体中,静脉给予 d -麦角酸二乙酰胺(LSD)后,可得到行为应答与组织室中药物预测浓度之间的一个线性关系。

2. 间接的药理应答

与上述讨论的直接药理应答大不相同,有一些药理应答是间接的,代表了若干过程的净结果,在这些过程中只有一个受药物影响的。在这种情况下,可能得不到血浆浓度和药理应答之间的一个直接的关系。然而,如果药物对过程的影响可以分辨出来,那么药物浓度可与这个过程的变化相关联。可用口服抗凝血药如华法林的效应来说明这一概念。

华法林抑制了某些维生素K依赖凝固因子的合成。然而,华法林对这些因子的生理降解没有影响。因此,华法林的药理应答应基于对凝固因子合成的抑制作用,而不是凝血时间的变化。这些基于机理的模型可发现与很多药物的临床效应有关联^[4]。许多代谢和内分泌系统都提供了相似的建模策略^[5]。

3. 不可逆的药理应答

大部分药物产生的是一种可逆的药理应答。然而,有一些抗生素、不可逆的酶抑制剂和抗癌药物以不可逆的或共价形式掺入细胞的代谢途径。这产生了一个不可逆的作用——细胞死亡。复杂的动力学模型被用于解释一些药物的剂量-化学疗法效应的关系,如甲氨蝶呤、环磷酰胺和阿糖胞苷^[2]。

影响药物应答的因素

通常给药方案的产生是用平均药物动力学参数来维持药物的血浆浓度在治疗窗之内。对多数药物来说,包括有效药物浓度范围和中毒浓度都已经确定^[6]。然而,对于固定的药物,单个患者的血浆浓度也可能受许多药效学和药动学因素的影响。因此,在维持获得期望的药物治疗浓度水平时,必须将这些因素也加以考虑。

1. 药动学因素

1.1 影响吸收的因素

影响药物吸收的因素包括剂型组成、疾病状态、食物,还有药物之间的相互作用。口服给药剂型包括溶液、混悬液、胶囊、未包衣片和包衣片。由于剂型组成的不同,药物吸收的特征可能会有很大的差别。口服缓释剂型常常用于延长药物的作用,降低 c_{\max} 和 c_{\min} 之间的波动。

肠外科手术和疾病状态会改变某些药物的吸收,虽然有关这方面影响的信息是有限的。对于特定的疾病状态或外科手术,药物的吸收可能会增加、未改变或是减少的,这取决于药物本身。因此,特殊疾病条件对药物吸收的影

响通常无法根据现存的剂型处方来进行预测。

食物对药物在胃肠道中吸收的影响是易变的，其影响取决于药物的理化性质和吸收机制。胃中固体食物的存在易减小胃排空的速率而延缓对药物的吸收，这常常使药物的全身生物利用度减少。与禁食的受试个体相比，在早餐前 1h 和早餐后立即口服给予林古霉素，其相对生物利用度分别减少到大约 60% 和 20%。由于非禁食患者对催眠剂吸收的延缓，可能会出现潜在的危险情况。以安眠药乙甲戊酰脲为例，在禁食受试个体和非禁食受试个体之间，药物吸收的起始时间可以观察到 42min 的差别。

食物的存在还被发现会增加胃肠蠕动，并使内脏血流量增加 30%。结果，一些药物的吸收或是不受食物的影响，或是会因此增加。在 β -阻滞剂中，贝凡洛尔和氧烯洛尔的吸收不受食物影响，而美托洛尔、拉贝洛尔和普萘洛尔的吸收会增加，阿替洛尔和索他洛尔的吸收则会减少。在高脂食物的存在下，口服抗真菌抗生素灰黄霉素在体内的吸收会比没有食物存在时大大增加。因为小肠中的高脂肪浓度会刺激胆汁分泌，提高了相对亲脂药物在胃肠道中的溶出度，从而增加了药物的吸收。此外，由于食物消耗所引起的内脏血流量的增大也可以使吸收增加。然而，极性相对较大的药物和渗透性差的药物，在食物的存在下其吸收量则出现减少的趋势^[7]。食物的存在减少了阿仑膦酸盐、阿司咪唑、卡托普利、双脱氧腺苷和青霉胺的吸收。

食物对药物吸收的影响不仅取决于药物的理化性质，还取决于药物的剂型组成。在口服茶碱后，药物的吸收速率可因食物的存在而增大或减小，这取决于药物的剂型组成^[8]。通常，在餐后立即服药受食物的影响最大；药物和食物的相互作用程度随进食与服药的时间间隔的增长而减小^[9]。在文献中可找到大量关于食物对药物吸收影响的综述^[10~12]。

药物间的相互作用是另一个影响吸收的因素。一般而言，阻碍吸收的相互作用或是牵涉到药物在胃肠道中的结合或螯合作用，使药物不能被吸收；或者是对胃排空或胃肠蠕动有影响。另外，胃肠 pH 的改变也可影响某些药物的吸收。

抗酸剂，尤其是氢氧化铝凝胶，可在消化道中形成一种不溶性的复合物从而减少大多数四环素类药物的吸收。同时给予铁（硫酸亚铁）和四环素、氧四环素、甲烯氧四环素或脱氧四环素，会严重减少对这些抗生素的吸收。吸附药，如高岭土（一种止泻药）会大量减少林古霉素和丙咪唑的吸收。离子交换树脂，如消胆胺，可在胃肠道中强烈结合许多阴离子和中性药物，阻碍抗凝剂和甲状腺素的吸收。丙咪唑可明显降低左旋多巴在人体内的生物利用度，推测大概是因为胃排空时间的减少延缓了左旋多巴的吸收，从而使其在消化道中的代谢增加。口服给予酮康唑需要一种酸性介质来充分溶解，因此抗酸剂、抗胆碱能药、 H_2 阻滞剂或质子泵抑制剂（如奥美拉唑）会降低酮康唑的生物利用度。甲氧氯普胺、西沙比利和通便药可增加胃肠蠕动，因此可能会降低那些需要增加与吸收表面接触和只在胃肠

道特定位置吸收的药物的吸收。抗胆碱能药能减少胃肠蠕动，因而可通过增加药物与最佳吸收区域的接触而增加吸收，或者通过减缓溶出和胃排空而减少吸收。药物之间的相互作用已有详细的综述^[13~15]。

1.2 影响分布的因素

在进入体循环后，药物被运送分布到全身各个不同的组织部位。药物的分布取决于与血浆蛋白、红细胞和组织结合的相对亲和力。然而，在其他药物的存在下，或者是在某些疾病状态下，还有因患者的年龄不同，药物的分布是可以改变的。

将药物从蛋白中置换出来而引起的相互作用的风险是显著的，主要是那些蛋白结合率高（>90%）、表观分布容积小和治疗窗相对狭窄的药物。这样可使非结合药物的浓度暂时升高（在开始的几天），因而可能会有重要的临床影响。三氯乙酸为水合氯醛的主要代谢产物，可将华法林从与其与血浆白蛋白的结合位点置换出来。这一置换可暂时地提高华法林的血浆浓度水平，从而增加每单位剂量的药理效应。给予受试者每天 1g 水合氯醛一星期，可使华法林的抗凝血作用增加 40%~80%。当丙戊酸和苯妥英同时服用时，会使未结合苯妥英的浓度在一些患者中显著增加而引起更多的副反应，即使苯妥英的总血清浓度仍在通常的有效治疗浓度范围内。

疾病状态是另一个可能影响药物与血浆蛋白和其他组织结合的因素。在不同的疾病下，已观察到药物与血浆蛋白的结合率会显著变低。例如，正常受试者血浆中未结合苯妥英的百分比为 5.8%~7.3%，而在肾病患者中（氮血症或尿毒症）未结合苯妥英的百分比为 8%~25%。此外，还有报道说肾病、肝病、高胆红素和高脂血症会使某些药物的血浆蛋白结合降低。然而，在一些生理应激反应下（如心肌梗死、外科手术、溃疡性结肠炎和克罗恩病），碱性药物（如普萘洛尔、奎尼丁和丙吡胺）的血浆蛋白结合会增加，其分布容积则因 α_1 -酸性糖蛋白浓度的增加而相应减小。

有报道说，药物分布的变化跟年龄也有关系。新生儿和婴儿的表观分布容积要比成人大一些。磺胺甲噁唑在新生儿和婴儿中的估计分布容积分别为 0.47L/kg 和 0.36L/kg，而在儿童、成年人和老年人受试者中则为 0.20~0.26L/kg。甲氧二氮草的分布容积在老年人中（0.52L/kg）比在年轻人中（0.42L/kg）大。分布容积因年龄而产生的差别可能是由于血浆蛋白结合的不同或是体内隔室相对大小的差异。

1.3 影响代谢的因素

药物代谢作用是从体内移除药物的主要机制。药物代谢作用可受年龄、疾病状态、多态现象和药物代谢酶的抑制或诱导作用影响。性别差异对药物代谢作用的影响在人类中是较次要的，在临床研究上通常并不重要。

虽然与成人相比，在新生儿中肝的药物代谢作用通常





比较缓慢,但实际上儿童对某一特定药物的代谢比成人更迅速。在儿童中,茶碱的半衰期平均为 3.7h,而在不抽烟的成人中其范围为 5~9h。儿童对安替比林、克林霉素、二氮嗪和苯巴比妥的代谢也比成人迅速。有报道说,老年受试者对某些药物的代谢效率(例如,异戊巴比妥、安替比林、保泰松和甲氨二氮草)比年轻受试者低。因此,衰老过程可能会降低药物的总体清除率并延长药物的消除半衰期。口服异戊巴比妥后,在 0~24h 内,药物以羟基代谢物的形式从尿中排泄的平均剂量百分比,在年轻受试者中(年龄为 20~40 岁)为 14%,在老年受试者中(>65 岁)则降到只有 4%。甲氨二氮草的表现消除半衰期表现出强烈的年龄相关性,在年轻人中平均为 9.5h,在老年人中则增加到 37h。结果,这些药物的血浆浓度在老年受试者中比在年青受试者中高。

代谢作用的遗传多态现象在药物消除的变异性中是一个非常重要的因素。异烟肼(和其他含有联胺结构的药物,如磺胺二甲嘧啶、磺胺吡啶、胍屈嗪、普鲁卡因胺和氨苯砜)的代谢,在一些个体中比在其他个体中迅速。异烟肼在人体内的主要消除途径是通过肝 N-乙酰转移酶代谢成乙酰异烟肼,因此其半衰期取决于药物能多快被乙酰化。在大约 50% 的美国人口和 5%~10% 亚洲人口中,肝的 N-乙酰化作用是比较缓慢的。在代谢作用迅速的那些人中,药物的半衰期为 45~80min,而在那些代谢缓慢的人中,其半衰期为 140~200min。慢速乙酰化器需要较长的时间去乙酰化这些药物,因此对母体化合物引起的不良反应也比较敏感(例如,异烟肼引起的末梢神经炎,胍屈嗪或普鲁卡因胺引起的红斑狼疮,苯乙肼引起的镇静和恶心作用)。与慢速乙酰化器相比,快速乙酰化器需要这些药物的较大剂量和较频繁的给药,以达到所期望的治疗应答。

由细胞色素 P450 (CYP) 同工酶 CYP2D6、CYP2C9 和 CYP2C19 代谢的药物也呈现出遗传多态现象。以 CYP2D6 代谢异喹胍为例。在 5%~10% 的北美和欧洲的高加索人以及大约 1% 亚洲人中,异喹胍的 4-羟基化作用被减少,这样的个体中毒的风险(直立性低血压)也增加了。 β -阻滞剂(美托洛尔和噻吗洛尔)、抗心律失常药(恩卡胺和氟卡胺)、三环抗抑郁药(阿米替林、去甲替林和地昔帕明)和一种镇咳药(右美沙芬)也由 CYP2D6 代谢。因此,在 CYP2D6 代谢者中,与代谢者相比会观察到显著的治疗应答和更多的不良反应。

苯妥英是由 CYP2C9 代谢的。在 CYP2C9 代谢者中,可观察到其毒性的增强(例如,过度的中枢神经系统抑郁)。S-美芬妥因通过 CYP2C9 立体选择性代谢。3%~5% 的北美高加索人和 20% 亚洲人对美芬妥因的代谢缓慢,这也增加了他们出现一种主要不良反应的风险(暂时性镇静作用)。在这样的人中,和美芬妥因一样通过相同同工酶代谢的其他药物也代谢缓慢,这些药物的药理活性和不良反应也会增加。这些药物包括甲基苯巴比妥(一种抗惊厥剂),白乐君(抗疟药),可能还有地西泮(一种抗焦虑剂)。这些药物的半衰期在代谢者中比在泛代谢者中很长

多。因此,对于代谢能力有限的患者必须谨慎使用。

其他遗传多态现象包括醛脱氢酶-2(一种与乙醇代谢有关的酶)、醇脱氢酶(另一种与乙醇代谢有关的酶)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PD)或谷胱甘肽合成酶的缺乏。患有 G6PD 缺乏症的患者(大约 10% 的黑人男性),当给予氧化剂类药物,如抗疟药(如氯喹、扑疟喹和伯氨喹)、阿司匹林、丙磺舒和维生素 K 时,出现溶血性贫血的风险将增加。如果给予通过谷胱甘肽结合代谢的药物,如对乙酰氨基酚和吡喃妥因,肝细胞中谷胱甘肽合成酶水平低的患者肝细胞受损的风险也将增加。

一些疾病状态对药物的代谢也可能会有显著的临床影响。如果肝代谢是药物消除的一个重要途径,则肝功能的任何异常都会导致该药药物代谢动力学的改变,而药物的血浆浓度也将会与那些肝功能正常的患者不同。药物消除变化的临床意义取决于疾病的类型或严重性。安替比林常常被用作模型药物来研究肝病对氧化类药物在人体中代谢的影响。在健康受试者中,安替比林的平均半衰期大约为 12h。与此大不相同,在肝硬化或慢性活动性肝炎患者中,安替比林的半衰期平均分别为 34h 和 26h。然而,对于特异性药物,安替比林的半衰期提供不了在患者中药物消除减退程度的一个定量的指数。其他一些由于特定疾病状态减弱代谢作用而使半衰期在患者中发生改变的例子还包括:环己烯巴比妥与肝炎,哌替啶与肝硬化,普萘洛尔与慢性肝病,还有利福平与梗阻性黄疸。

酶诱导或抑制作用是另一个改变许多药物代谢速度的因素。许多药物,如稠环烃、杀虫剂和其他环境化学试剂(如吸香烟)会刺激肝微粒体酶的活性。其结果是,重复给予某一药物或全身性连续暴露于某一化学试剂下,可通过增加代谢而有助于其他药物的消除。苯巴比妥和其他巴比妥类药物是人们研究最广泛、在人体中最有效的诱导剂。在重复给予苯巴比妥 $[2\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 4 个星期的期间内,可在第一个星期后观察到华法林效力的显著降低,这是用平均凝血酶原时间显著减少来表示的。利福平也可诱导华法林的代谢。当给予每天服用华法林的受试者 600mg/d 的利福平后,华法林的血浆浓度水平降至接近无法检出的水平。

一些药物,如利福平,可诱导它们自身的代谢作用。在重复给予利福平每日剂量为 600mg 的 30 天内,利福平的消除半衰期在第一天和最后一天分别为 4.2h 和 1.9h。卡马西平也显示了显著的自诱导作用。从单次剂量所获数据预测的稳态血浆浓度比在长期治疗中所观察到的实际浓度高 2~3 倍。

与酶诱导作用通常出现药物效力下降的临床结果相反,药物代谢的抑制作用能使药物蓄积到中毒浓度而导致发生严重的不良反应。然而,通过鉴别与底物代谢作用相关的 CYP 同工酶和抑制因素,并测定其体外抑制常数,在很多情况下就可预测有临床意义的药物相互作用。氯霉素在人体中是一种有效的 CYP2C9 底物代谢抑制剂(如甲苯磺丁脲、苯妥英和双香豆素)。给予 2g 氯霉素若干天后将使甲



苯磺丁脲和苯妥英的稳态血清浓度有显著的上升。同时再服用磺胺苯吡唑可以使甲苯磺丁脲的血浆浓度-时间曲线下的面积提高 5 倍。

在 CYP 同工酶之中, CYP3A4 与人体内源性化合物的代谢相关, 代谢与其相关的药物范围也最广。人体肝中 60% 的 CYP 亚型也与其有关。因此, 如果某种药物由 CYP3A4 代谢, 一起服用的其他药物也由 CYP3A4 代谢的话, 则可能会引起药物之间的相互作用。例如, 酮康唑可抑制无镇静作用的抗组胺药特非那定和阿司咪唑, 还有西沙比利的代谢。由于 CYP3A4 的抑制作用, 这些药物可能会出现危及生命的心律失常的副作用。在文献中可找到广泛的有临床意义的关于药物相互作用的综述^[16]。

1.4 影响排泄的因素

药物肾脏排泄的实现是通过 pH 依赖性扩散和主动分泌完成的。尿液的 pH 可因疾病状态、饮食因素或同时服用的其他药物而改变。尿液 pH 变化对酸性和碱性药物消除速率的影响可以是显著的, 并且只要在尿中排泄是药物消除的一个重要途径时就可根据 pH 分配假说进行预测。

对于酸性药物, 碱性越强的尿液可增加药物的电离浓度, 并减少在末端小管的重吸收。其结果是, 药物的消除会加快。另外, 酸性越强的尿液使酸性药物的电离浓度下降, 而使重吸收增加, 使消除变慢。给予人受试者磺胺乙二唑后, 当尿液 pH 从 5 增加到 8 时, 其半衰期分别从 11.4h 下降到 4.2h。通过给予碳酸钠使尿液 pH 从 6 增加到 8, 可使磺胺甲氧嘧啶和磺胺二乙基嘧啶的消除速率加倍。当人尿的 pH 低时, 水杨酸盐的消除较慢, 血浆浓度较高。

对于碱性药物, 在尿液的 pH 低时, 尿中排泄增加; 尿液 pH 高时, 则尿中排泄减少。其结果是, 服用苯异丙胺或相近药物的患者, 尿液相对较小的 pH 变化就可使患者处于危险之中。碱性尿的患者在给予最后一次剂量的安非他明后, 可出现持续超过 3 天的精神紧张。

肾脏功能因年龄的改变在选择给药方案时是一个非常重要的因素。新生儿的肾脏功能还未完全发育成熟。新生儿的肾血浆流量和肾小球滤过率(按体表标准化)只有成人的 30%~40%。青霉素 G 的半衰期在新生儿中(一直到 6 天大)为 3.2h, 在婴儿中(14 天大或更大)为 1.4h, 而在年长的儿童和成人中, 则大约为 0.5h。庆大霉素的平均半衰期在小于一周的新生儿中大约为 5h, 在一到四周大的婴儿中大约为 3h。庆大霉素在较大的婴儿和成人中大约为 2h。因而, 以肾脏排泄为主要消除方式的药物在婴儿体内的停留时间将较长。

肾功能受损对药物消除的影响程度不同, 这取决于肾清除对总体清除率的贡献程度。肾清除对总体清除率的贡献越大, 肾病对药物消除和重复给药时的稳态血浆浓度的影响就越大。

2. 药效学因素

药物在共同受体位点相互作用或有累加或抑制效应的

例子有很多。也有一些其他的相互作用的例子, 从表面上看有药效学性质而对其机制却所知甚少。

单胺氧化酶(MAO)抑制剂, 如苯乙肼或反苯环丙胺, 可使去甲肾上腺素在肾上腺素能神经元内蓄积。因而, 能释放大量的去甲肾上腺素(如间接作用的拟交感胺、安非他明和苯丙醇胺), 能产生一个放大的应答, 包括剧烈头痛、高血压和心律失常。MAO 抑制剂存在于很多用于感冒、过敏的非处方药物和饮食制品中, 服用 MAO 抑制剂的患者应避免同时服用这类产品。

个体给药方案的优化

给药方案是利用平均药动学参数来确定的。然而, 即使在正常个体中也存在不可预知的变数。对很多药物来说, 可观察到的 F 、 CL 和 V_{ss} 的一个标准偏差的值分别大约是 20%、50% 和 30%。因此, 在 95% 的情况下, 基于平均药动学参数达到的 c_{ss} 将会在目标浓度的 35%~270% 的范围内。这不是一个可接受的范围, 特别是那些治疗指数狭窄的药物。如果 F 、 CL 和 V_{ss} 可以直接测定, 给药剂量可以用体重或体表面积, 药物和药物之间的相互作用, 还有疾病状态, 如肾脏损伤(对于经肾排泄的药物而言)等因素进一步调节的话, 则可以为特殊患者制订一个更为精确的给药方案。

1. 根据体重调节剂量

相同分量的药物在不同的个体中能得到不同的药物血浆浓度, 因为药物的表现分布容积取决于体内隔室的大小与药物在血管内和血管外的相对结合率。脂肪比率正常的受试者的全身含水量和细胞外液体积与体重成正比。在表现分布容积和体重之间, 还有稳态血药浓度和体重之间都存在一定的关系。要在不肥胖的成人中把治疗血药浓度维持在稳态水平, 最好是按照体重来确定剂量(mg/kg)而不是给予每个患者固定的剂量。

极性相对较大的药物(如地高辛和庆大霉素)易局限分布在体液中, 而脂溶性高的药物(如硫喷妥钠)则易分布进入脂肪。因此, 对于极性药物, 用去脂肪体重代替总体重可以使肥胖患者的剂量-应答关系更易预测。实际上, 如果按总体重计算地高辛的剂量给予肥胖个体, 药物的血浆浓度将会高到危险水平。

单个个体的脂肪比例和去脂肪体重可用下述方程(9)和方程(10)来估算。

$$\text{脂肪}\% = 90 - 2(H - G) \quad (9)$$

式中: H 为高度, cm; G 为围长, cm。

$$\text{去脂肪体重} = (100 - \text{脂肪}\%) \times \text{体重} \quad (\text{以 kg 为单位})$$

$$(10)$$

2. 根据体表面积调节剂量

儿童比成人需要也能忍受更大的以 mg/kg 计的剂量, 但不能将其看成一个小的成人。例如, 地高辛的给药要求

维持平均血药浓度在 1~1.5ng/mL, 对于 4 周到两岁的儿童, 其给药剂量为每天 15~20 μ g/kg; 对于 2~12 岁的儿童为 10~15 μ g/kg; 对于成人则为 4~5 μ g/kg。对儿童所需剂量的合理估算, 通常通过计算儿童相对于成人的体表面积得到。体表面积可用式 (11) 进行估算。

$$S = (W^{0.425} \times H^{0.725} \times 71.84) / 10^4 \quad (11)$$

式中: S 为体表面积, m^2 ; W 为体重, kg ; H 为高度, cm 。儿童体表面积的近似值可用下述简化方程 [方程 (12)] 获得:

$$S = 0.088W^{0.728} \quad (12)$$

成人的平均体表面积通常大约为 1.73 m^2 。

一般而言, 平均 3 个月大体重为 6kg 的儿童, 其按体表面积调节的剂量是给予普通成人的按体重调节的剂量 (mg/kg) 的 2 倍大, 而对于平均 5 岁大体重为 20kg 的儿童, 按体表面积调节的剂量是按体重调节的剂量 (mg/kg) 的 1.5 倍。儿童按体重调节而所需要的剂量 (mg/kg) 比成人大, 可能有一部分是由于儿童体重中全身含水量和细胞外液所占的比例比成人的要高。

3. 根据药物相互作用调整给药

流行病学研究证明, 如果同时服用 5 种或更少的药物, 与药物有关的不良反应的比率大约为 4%。然而, 当所开的处方中有 20 种或更多的药物时, 不良反应的比率增加到 45%。因此, 患者应尽可能同时服用尽量少的药物。如果需要多于一种的药物疗法, 而同时服用的药物之间也已知有显著的临床相互作用, 则单个或多个药物的剂量可基于个别患者的临床应答和副反应的严重程度而增加或减少, 或者每一种药物可按一定的时间间隔给药, 这取决于应用联合疗法时的情形。当中断一种或多种药物的给药后, 给药方案中的其他药物可重新调整用于继续治疗。如果某一药物或药物的某一特定剂型组成已知有食物效应, 则药物或剂型必须至少在食物摄取前或摄取后 1h 给药以得到可靠的治疗。

4. 根据肾脏损伤调整给药

药物的肾清除率与内生肌酐清除率成比例, 不论其机制是什么 (即过滤、重吸收或分泌), 肌酐清除率可指示疾病的严重程度。进一步讲, 可基于肌酐清除率和药物在正常受试者中的药动学知识, 预测药物在肾病患者中的半衰期, 正如头孢唑啉在图 3 中所示的那样。

一些药物的半衰期在肾功能受损患者中变化很大, 而需要加以考虑改变正常的给药方案, 以阻止药物在体内的蓄积中毒。用药改变的形式通常是减少每一给药间隔的剂量或增加给药间隔的长度。任一形式的改变通常都是粗略地与药物半衰期在有肾病和没有肾病的患者中的相对差别成比例的。头孢氨苄的给药剂量为 250mg~1g 每 4~6h。它的半衰期对于肾功能正常的患者为 0.5~1h。对于一个肌酐清除率为 10~15mL/min 的患者, 药物的半衰期增加了大约 8 倍, 因为头孢氨苄的消除几乎完全是通过母体药物

在尿中排泄的。对这个患者的给药频率建议是每 24h 给予一次常用剂量, 这个给药间隔是正常给药间隔的 3~6 倍长。已经有一个综合的指南可指导药物在肾功能受损的成年患者中的使用^[17]。

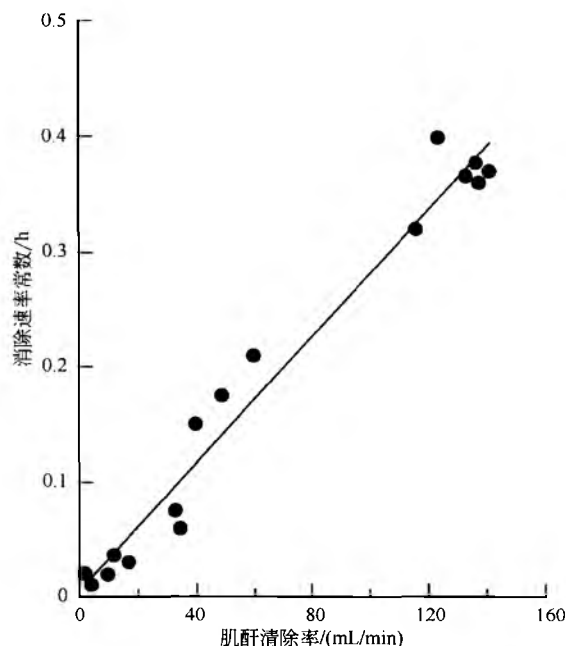


图 3 单剂量肌内注射头孢唑啉后肾功能 (用肌酐清除率表达) 和总消除速率常数的关系^[17]

5. 根据其他疾病调整给药

如果药物的主要消除途径是通过肝的代谢作用, 而患者有肝功能障碍, 则可减少药物的剂量或给药频率。然而, 与肾功能不全的患者不一样, 药物消除在肝功能障碍个体中的减退程度是无法预测的。一般而言, 当肝病是非活性时, 还是需要对给药方案做少许改变的, 虽然对于镇静剂和抗抑郁药应保持低剂量并给予特别的关照。对于有肝病的患者, 一些药物的给药方案 (如镇静药和镇痛药) 应该边增加边观察, 直到他或她出现临床应答为止。在选择给药方案的实际例子中, 应该对药物的血浆浓度进行监测, 并基于血药浓度的测定调整给药方案。

通常推荐, 血浆蛋白结合因疾病状态而改变的并不需要调整剂量。然而, 对于低蛋白血症的患者, 发生药物中毒的几率将会增加, 因而应减少给药剂量。显示中毒的患者除了血浆蛋白结合改变外, 药物的消除可能也会受损。实际上, 已经有人建议低血清白蛋白浓度可作为肝功能完整性的一个标记。

参考文献

1. Holford, N. H. G.; Sheiner, L. B. Clin. Pharmacokinetics 1981, 6, 429-453.
2. Gibaldi, M.; Perrier, D. Pharmacokinetics; Marcel Dek-

- ker, Inc.; New York, 1982.
3. Sheiner, L. B.; Stanski, D. R.; Vozeh, S.; Miller, R. D.; Ham, J. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1979, 25, 358.
 4. Jusko, W. J.; Ko, K. C. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1994, 56, 356—358.
 5. Carson, E. R.; Cobelli, C.; Finkelstein, L. *The Mathematical Modeling of Metabolic and Endocrine Systems*; John Wiley & Sons: New York, 1983.
 6. Benet, L. Z.; Sheiner, L. B. *Design and Optimization of Dosage Regimens: Pharmacokinetic Data. The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th Ed.; Gillman, A. G., Ed.; Macmillan Publishing Co.: New York, 1985; 1663—1733.
 7. Lee, K. H.; Xu, G. X.; Schoenhard, G. L.; Cook, C. S. *Pharm. Res.* 1997, 14, 1030—1038.
 8. Cook, C. S.; Hauswald, C. L.; Grahn, A. Y.; Kowalski, K.; Karim, A.; Koch, R.; Schoenhard, G. L.; Oppermann, J. A. *Inter. J. Pharm.* 1990, 60, 125—132.
 9. Karim, A.; Burns, T.; Janky, D.; Hurwitz, A. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1985, 38, 642—647.
 10. Welling, P. G. J. *Pharmacokinet. Biopharm.* 1997, 5, 291—334.
 11. Toothaker, R. D.; Welling, P. G. *Ann Rev. Pharmacol.* 1980, 20, 173—199.
 12. Fleusher, D.; Zhou, Y.; Pao, L. H.; Karim, A. *Clin. Pharmacokinet.* 1999, 36, 233—254.
 13. Griffin, J. P.; D'Arcy, P. F.; Speirs, C. J. *A Manual of Adverse Drug Interactions*, 4th Ed.; Butterworth & Co.: Oxford, UK, 1988.
 14. Grahame-Smith, D. G. *Drug Interactions*; The Macmillan Publishing Co.: New York, 1977.
 15. Prescott, L. F. *Drugs* 1973, 5, 161—186.
 16. Michalets, E. L. *Pharmacotherapy* 1998, 18, 84—112.
 17. Bennett, W. M.; Singer, I.; Coggins, C. H. *JAMA* 1973, 223, 991—996.

参 考 书 目

- DeVane, C. L.; Jusko, W. J. *Dosage Regimen Design. Pharmacokinetics: Theory and Methodology*; Rowland, M., Tucker, G., Eds.; Pergamon Press: Oxford, UK, 1986; 213—233.
- Holford, N. H. G.; Sheiner, B. L. *Kinetics of Pharmacologic Response. Pharmacokinetics: Theory and Methodology*; Rowland, M., Tucker, G., Eds.; Pergamon Press: London, UK, 1986; 189—212.
- Rowland, M.; Tozer, T. N., Eds. *Clinical Pharmacokinetics Concepts and Applications*; Williams and Wilkins: Media, PA, 1995.
- Welling, P. G. *Pharmacokinetics*; American Chemical Society: Washington, DC, 1986; 7—76.

(谢家树 译)



Y

药物的临床评价

Allen Cato

Lynda Sutton

Cato Research Ltd., Durham, North Carolina, U. S. A.

Allen Cato III

Cato Research Ltd., San Diego, California, U. S. A.

引言

新药开发的过程,从潜在药物候选物筛选到上市后的监测,是非常复杂的。新药研发过程中需要多学科多成员一起进行研究和协作。从药物发现到进入药物上市平均需要13年的时间。一旦化合物被确定为药物候选品种,在进行人体试验前必须完成大量的临床前试验。药理、毒理和临床前药代动力学必须有特色。用于临床前研究的药物剂型可能不同于最后的药物剂型,这需要通过药代动力学和药剂学的深入研究才能确定。如果临床前的试验评估证明药物候选物是有特色的,那么才可能在人体上试验。此时,药物将进入研发的临床研究阶段。

临床研究是新药开发中的一个重要阶段。来自人体第一手资料、I期的药代动力学研究以及健康志愿者的最初安全评估能够肯定或否定新药候选物的整个研究计划。当然,申请新药的公司希望在这些最初研究中收集到的数据能够说明新药在足够的剂量范围内显示最小的安全问题。药代动力学资料可以用来帮助研究设计今后如何评估新药的有效性和长期安全性,也可以帮助后期药代和药效研究的数据收集。

虽然最初的单个和多个剂量增加研究通常是线性的(但是起始剂量常常需要经过激烈的讨论才能确定),但是这些研究和今后的研究必须计划好,以引起对特定问题的注意。这些特定问题由于众多特定的考虑而不同:包括目标疾病状态(如急性的还是慢性的);期望的安全性、有效性和药代动力学评价;临床药理学评估(如剂型或服药频率等)。基本研究的每一步也必须认真考虑。所以,从设计、实施、数据报告和分析到最后的研究报告,只能通过多学科药物研究团队的协调努力来共同完成。

对于每项临床研究,需要不同专业领域的专家加入。一个药物研究团队成员包括:医师、科学家、药师、项目经理、统计人员、计算机程序员、研究监察员、统筹专家,对于某些研究,还包括制剂小组代表。虽然某些部门成员能从事多项任务,但是没有任何部门的成员有能力或足够的时间参与临床研究中的每一件事。此外,一些成员可能有多项能力,那么可以号召有特别专长的人共同参与。举例来说,药物动力学成员擅长于药代动力学研究,同时也可能在药剂学、生物统计学和临床上有所了解。但是药代

动力学家主要精通基础研究,而医师在临床用药方面很专业。因为单个药物开发程序来自于这两类不同学科,所以相当多重叠、合作和协调对于药物从开发到上市的成功是必需的。

临床药物研究通常分为4个阶段:第一阶段到第四阶段。对于每个阶段内实施的研究,应根据药物研究的要求收集特定的信息。安全性、药效学和药代动力学数据的采集是大多数临床实验的焦点。虽然这些信息属于不同学科,但是它们常常被综合起来,从不同方面来评估药物的根本性质。如能在多项研究中得到药物的安全性、药效学和药代动力学数据,那么研究小组就要建立这些数据的收集类型和信息范围,这些数据将根据特定目的和研究设计的不同而有所区别。

药物研发团队的一个关键功能是研究方案的设计。研究方案需要清晰地描述出可以用来完成研究的设计和方法。像营销和信息技术专家这样的非医学、非科学成员的加入,在建立研发策略、设计和临床研究等方面都是有帮助的。最后,项目计划可以使团队同步努力,帮助降低药学研究的上涨费用,协调国际交流发展。

药物研究团队的基本目标是获得许可并上市销售药物,这需要将上市申请提交给管理机构[如新药物申请(NDA)在美国可以提交给食品药品监督管理局(FDA),在加拿大则提交给健康产品食品分部(HPFB),而上市授权申请(MAA)在欧洲则提交给欧洲的管理机构]。在研究实施、编辑和分析数据的时候,团队必须考虑和评估很多问题,如应该如何收集、分类和报告不良反应等。所有这些结论均影响药物申请和最终确定药物如何被使用。

许多结论由团队做出,像伦理上进退两难处境的决定将由研究者得出。法律扮演着保护受试者的角色,最近,临床研究科学家关心的生物技术和基因工程研究正面临着伦理上的困境。

各种管理部门时常变更的管理规程和指导方针,及这些规程在解释上的差别,以及有关药物不良反应的特殊报告机制,只是药物研发团队面临挑战的一部分。随着科学信息的不断发展、疾病原理的深入了解以及基因治疗的不断发展,现代药物管理规程发展也将随之发生变化。但是,通过合理的科学在伦理方面的有效运用和团队的协调努力,有效的新疗法将继续得到发展和推广。



药物研发团队成员的角色

1. 医师

在过去的几十年,医师在药物研发过程中的贡献和在药物研发队伍中的角色都发生了变化^[1]。20世纪60年代前,药物公司的医学部门主要由医师组成仅参与常规的反馈医药信息而不是发展新药。直到1962年,通过了Kefauver-Harris修正案,要求医药公司在上市前必须证明其药物是有效的,这使得医师加入到药物研发队伍中来。随着附加的政策性规程的出现,复杂性医学问题的增加,要求医师成为任何药物研发队伍中的一个整体性成员。实际上,因为医师在团队内以不同角色出现,药物公司在其医学部门内设有各种不同的分支部门(如临床研究部门和临床安全部门)。

虽然医师在治疗患者方面受过培训,但是被制药公司雇用的医师在科学研究方法方面要比在过去受到更多的培训。研发队伍中的医师有资格追踪临床实验中每个参加患者的进展情况,并对结果进行解释。一些医师可以继续花时间在大学附属医院或特定诊所中治疗患者,在那里他们的专长可以得到发挥和锻炼。同时,也有一些医师可能利用学院设备进行基础研究,来发展或保持他们在基础研究中的知识和技术。

然而,今天许多临床研究实际上并不是由药物研发公司雇用的研究者实施的。药物研发队伍中的医师将帮助选择合适的研究者实施临床研究。制药公司的医师可以依靠那些在各自领域中有所专长,并有一定数量患者和设备的同事来实施项目计划。此外,医师也是处理临床研究中增长的紧急事件的专家,如过量用药或药物可能出现的严重不良反应经历(SAE)。同样,医师协助负责评估不良反应经历严重性(AES)的调查人员,确定药物与不良反应之间的关系。

随着临床研究的完成,医师在临床研究中的参与并没有结束,必须撰写医学报告、临床研究报告和NDA部分,而且可能经常需要医师与管理机构保持联系。临床研究中的医师也可能被召集在科学界中,通过组织座谈和讨论促销新药,或者在杂志上刊登广告,提供医学有效性和准确性等资料。

医师在临床药物研发计划中的角色已经延伸,并且在最近40年内得到精炼。医师越来越具有临床和科学研究专门知识和管理技术。今天,药物研发团队中的许多医师花费更多时间来设计和实现研究、解释和报告数据,而不是直接与患者接触。一个富有经验的临床医生是任何一个药物开发团队中的重要成员。

2. 科学家

一个药物研发团队可能只有一个主要医师,但可能有多个学科的科学家的,如药代动力学家、药理学家、毒理学

家和药学家等,他们都参与新药的临床研发工作。科学家在科学的方法建立和基础研究方面对新药研发做出了应有的贡献^[1]。

医师在看病发现问题方面受到专业训练,而科学家则侧重于科学研究中解决问题的能力 and 技巧方面的训练。任何一位科学家都需要通过实施具体方案并撰写一篇具有一定广度和深度的研究论文来获得博士学位。在这个过程中,科学家将了解和掌握如何解决来自不同方面的问题。此外,科学家也将收集大量数据,并通过数据分析,来帮助决定临床试验数据的可行性。同时,一些科学家,如有药学背景的药代动力学家,在学习过程中也需要接受一些临床上的课程。

科学家将协助设计临床事件报告格式(CRF)和大部分研究记录。研究记录用于记录研究过程中的全部计划和实施情况,因此需要包含特定类型的数据:①目标疾病的背景知识;②所研究药物的结构式和理化性质;③初步的药理学和毒物学研究(针对特定研究目的和设计);④用于研究的方法和材料;⑤关于药物包装、分类、剂量确定等信息和解救程序;⑥过量配药的管理;⑦患者停止服用药物的程序;⑧解释经广泛讨论后确认的制度;⑨任何相关参考资料。CRF也是每个患者在临床试验期间的数据记录。正是通过这些数据,临床和统计分析才得以实施。所有被规定在研究记录中的数据,均需收集在CRF上。

在非科学工作人员的协助下,科学家负责确定CRF是否将根据规定的目的、测试和评估来得到适当的数据。同时,密切注意一些部门的特别试验或样品收集,避免试验或收集过程中出现时间上的冲突。

基础研究的经验使科学家能够在公司和新药研发过程中发挥重要的连接作用。每个专业部门,如药物的代谢、微生物学、药理学和毒物学都需要早期人类安全研究的信息和药代动力学研究的内容,如此才能继续计划,实施长期动物研究。因此,在新药开发过程中,临床科学家与基础研究科学家之间的沟通十分重要。

因为临床研究已经逐渐变得更加科学,所以掌握科学方法学的专家对于整个研究计划是完全必需的。新药研发队伍中的科学家可能分为若干个专业,但是角色重叠可能形成合乎科学的和谐的医学性团体。除了科学上的专长外,科学家管理才能的发挥,如人员组织技巧和亲密练习将有效地推动新药开发。因此,科学家常被雇用来管理多个部门的协作。

3. 药师

在新药研究中,药师的角色因其药学背景而获得更为广阔的施展空间。药师可以为医学研究提供很有价值的治疗建议。因此很多药学院致力于将药师培训成为既有临床技术又有科学研究方法的临床专家。有许多课程被设计来培训和发展药师,使之成为临床专家^[2]。药师在拥有了全面的临床用药和配药专业知识后,就能够衔接临床与实验室之间的交流。



医师的侧重点在于疾病状态的诊断，而药师则侧重于疾病的药物治疗，同时也研究药物的协同作用、积极控制和药物比较，包括与被研究的已上市药物的比较。因为药师了解上市药品，所以可以帮助设计这样的临床研究。

药师还可以胜任新药研究领域中的药物信息、进行教育和培训等方面的工作。药师可以在药物治疗中向医师（和其他健康专业人士）提供关于在市场上销售和研究中的药物信息。同样，熟悉临床和实验室情况，使药师能够参与教育和培训新药研究队伍中的新职员。既专又通的研究性药师能将药学专业与临床用药结合起来，并能担当教育家和药物信息专家。

4. 非科学人员

药物开发包括许多任务，其中可能不需要医师或科学家的专业知识。管理才能、创造力和出色的沟通能力在传统的医学和科学教育课程中并不重点强调，但是对于许多任务却可能是必需的。

药物开发所必需的管理才能包括将表面上完全不同但却紧密相关的概念合并为单个总体计划。综合计划可能意味着将研究文件组织成一个合乎逻辑的序列，或者帮助聚集 NDA 的各个部分。在第一个例子中，文件必须以一定的方式建立，从而使内部质量保证审核和 FDA 检查更加容易。在第二个例子中，需要 FDA 规程方面的知识和良好的概括能力。

创造力是一种不能通过正规培训获得的品质。创造力需要大胆地猜想，并且以更新、更好的方式表达出来，最终达到相同目标。创造力在临床药物研究中的例子可能包括各种报道的发展，这些报道能够支持由药物研发队伍生成的所有不同研究文件。

对药物开发中的个人工作来说，出色的沟通能力可能是最重要的品质，甚至对于那些具有强烈药学背景的工作。临床研究需要个人之间、组织之间、外来卖方或临床场所之间的广泛交流。信息流必须既充分又准确。例如，市场部必须经常与医学部交流，这样市场研究、广告和包装插图能够得到计划和评估。在这些情形下，缺乏强烈科学背景但是具有出色沟通能力的个人经常扮演联络员的角色。

临床研究的一个方面需要药物开发队伍个人做出广泛贡献，这就是研究监测。研究监测检查临床研究的计划、开始、管理和数据处理^[3]。在进行监测研究时，监测人员必须经常与研究人员交流，帮助确保数据得到准确采集，符合 FDA 规程，任何管理问题能够尽快得到解决。尽管传统上监测不具备科学背景，但是今天，许多监测人员在基本科学方面得到训练，有些甚至具有高级学历，这使他们能够更理解项目的科学方面。有效的研究监测人员具有广泛的才能。

临床研究程序的许多方面需要具有各类培训、教育和经验的个人，这样才能为药物开发进程做出贡献。尽管某些任务明确需要医师或科学家的临床或科学才能，但是其他任务更加适合那些专业技能较少但综合能力较强的个人。

临床药物开发阶段

在进行临床药物研究前，任何药物都需要经过多年的临床前研究，花费数以百万计的资金，并且提出无数个研究设想。基础研究队伍由化学家、药理学家、生物学家和生物化学家组成，对化合物的预期诊断目录和分类做出初步判断。选择一两个疗效较好的化合物做进一步的药理学评价和急性慢性毒理学动物模型测试。当新药的药理学活性和安全性两方面在至少两种动物上都符合要求的话，就可以进行临床研究。在临床研究之前，需要向药品管理部门提出包含临床前研究资料和临床研究计划的新药研究申请。

临床药物研究是一个持续过程，一般而言，新药开发分为 4 个阶段：批准前阶段（从第一阶段到第四阶段）和批准后阶段（第四阶段）^[1~4]。前三个阶段相对明确独立。但是不同阶段涉及不同类型的研究，而不是特定时期的研究。举例来说，生物等效性研究和药物之间相互作用研究都是第一阶段的研究内容，但是很可能在第三阶段开始后才进行研究。

1. 第一阶段

在药品管理部门批准新药后可以进行临床研究，第一阶段开始。第一阶段研究目标药物的安全性，并收集大量的药代动力学和药理学信息，为第二阶段研究的允许剂量和剂型确定提供依据。

第一阶段研究将被密切关注，特别是在健康成年人身上实施的项目和所要达到的目标（获得关于药物的安全性、药物动力学和药理学效应的信息）。此外，药物代谢和剂量变化引起的各类事件和疗效等信息也可以在这个阶段内获得。因为大多数化合物可用口服制剂作为初始研究的剂型，所以开始的药代动力学数据通常包括吸收的资料。同时，像药物之间相互作用、各种不同剂型的生物等效性评价和其他常规性研究都包含在第一阶段内。

通常，人体最初研究是逐步提升的单剂量耐受性研究。初始剂量可能以动物的药理学或毒理学数据为基础，如无作用剂量的 10%。然后，剂量再依据预先制订的计划逐渐增加，通常对斐波纳契剂量增加计划加以修改^[5]，直至出现危险时的剂量，这个剂量即为最大耐受剂量（MTD）。虽然最终目的是确定人体的急性安全性，然而，在研究阶段设计上以收集有意义的药代动力学信息为主。也可能收集到药效资料或替代药效测定。当然，因为大多数临床测定和检验必须做安全评价，所以药效参数的测定不可能是安全性和药代动力学数据收集的简单折中。

适用于药代动力学评估的生物样品，特别是血和尿，应该在以动物药物动力学数据外插为基础的间断时间区间内收集。取决于测定的灵敏性，应该能够测定健康受试者的半衰期和其他药代动力学参数，特别在较高剂量情况下。药物光照降解是了解毒理研究结果方面的重要因素。药代动力学的线性（剂量线性）或非线性也将成为后期研究的

重要因素之一。

初始剂量一旦决定,一个包括安慰剂、双盲和逐步增加剂量的研究就可以开始了。通常,需要招募一些健康受试者,虽然有时也需要患者(例如,当测试一个抗癌新药的时候,可能对健康受试者来说毒性太大而无法进行,这时就需要一些癌症患者)。这些研究一般包括两组或三组,每组有6~8人接受有效新药,另两个则使用安慰剂。小组将结合每个对象(受试者),根据剂量的线性范围、内部对象可变性的药物动力学、药物反应情况等方面得到更迭的剂量水平。

最初研究的受试者通常住院或在临床部门,以便临床试验能在可控制的情况下进行,并且任何紧急医疗事故都能以最快速度得到处理。通常通过安慰剂和双盲试验来确定药物疗效,如可以用安慰剂来区分是否为药物诱发的共济失调,或滤过性毒菌感染引发的二次共济失调。在第一阶段中,只有当MTD符合要求时才能认为所研究的新药是完全可行的。MTD一定要符合规定,这是因为临床事件(如呕吐)和特定剂量之间的关系在被控制的情况下提供对设计后期治疗计划而言很有价值的信息。同时,剂量范围和给药途径也应该在第一阶段期间给出。

一旦最初的研究符合要求,多剂量的安全性研究就会启动。在这项研究中,主要目标是在进行可控的药效试验之前,确定多剂量的MTD。多剂量安全性研究应该在尽可能多的方法中模拟真实的临床情况,但科学性和统计有效性一定要得到保证。服用安慰剂可以区分与药物相关或不相关事件。服药时间表(包括药量、频率、剂量增量和剂量减少等方面)应在药效试验后模拟服药过程。

特别需要指出的是,在第二研究项目中,给药维持两周时间。因为要依靠药物的药代动力学数据进行研究,所以时间可能会延长,以便药物和代谢物浓度可以达到稳态状态。同时,如果药物是用来治疗慢性疾病,那么研究持续时间可能要4周左右。因为要得到6个剂量水平的数据,需要在每2个剂量组中有6个接受有效药物的受试者和2个接受安慰剂的受试者数据,这意味着至少要预先招募24位受试者。与最初的研究相同,这些受试者也要在研究期间住院。

类似于最初的研究,也要得到药代动力学数据。这些数据将有助于确定以后药效试验的剂量。新药药代动力学信息可以从以下几方面收集:①确定在前期急性安全试验研究中得到的药代动力学参数是否可以正确预测多剂量药物药代动力学行为;②在急性试验研究中建立药代动力学的线性(也就是剂量、 C_{max} 和AUC的比例)方法学验证;③确定在多剂量情况下药物是否服从清除率的自动感应;④确定在早期的单剂量试验研究中无法确定的代谢物和蓄积信息。收集若干实验数据将综合得到这一信息,上述试验均需要采集血样和尿样。对临床药代动力学家的挑战是设计一个恰当的采样时间表,以最大限度地收集药代动力学数据,而不需要基于最初目的——临床安全参数的确定。

2. 第二阶段

新药开始进入临床后,就逐步实施第二阶段的研究。第二阶段的研究重点是药效,第一阶段药代动力学研究的数据可以用来优化最佳剂型。第二阶段研究不像第一阶段只做简单检测,而是在患者身上实施研究试验。这些试验研究是为了获得除药物动力学数据之外的有关药效和药理学机理的资料。得到的药代动力学和药理学数据在第二阶段中可以帮助优化药物剂量大小和剂型,并可能提供更多的关于药物安全性资料(如确定潜在的药物-药物相互作用)。

只有当MTD得到确定后,药效试验才可以开始。除此之外,健康志愿受试者的有效药代动力学数据是设计药效试验的关键。临床药代动力学家将在整个药效研究中协助完成这些药效试验的设计和实施,并分析血浆中药物浓度数据。

在药效试验的设计阶段,应当注意药物剂型及药效测定的关系。各种不同剂量的药物血浆浓度可以在最初两项研究中获得的数据基础上进行模拟。当选择一个最佳剂型时,疾病或试验患者的生理状态(如老化的功能性障碍)、协同治疗(如酶诱导物或抑制剂)以及较早得到的安全性数据都需要考虑。此外,如果药物的目标位点位于隔膜组织中,那么在这个隔膜组织中的理论药物浓度将要被模拟,这有助于科学家们确定适当的放大倍数来测定药效。

为了完善药效试验,需要结合血药浓度和关键的安全性及药效参数来确定有关血药浓度的治疗框架。目标是从同一个患者的最初血药浓度数据中确定个性化的剂量,改善药物疗效和安全性。

3. 第三阶段

如果早期的临床研究已经建立了关于该药物的疗效、临床药理学和毒理等方面的特性,且在这个基础上仍认为是一个有希望的药物,那么第三阶段的临床实验就可以启动。第三阶段研究需要更多的患者,可以在专门医疗机构或其他有这样设施的场所进行研究。第三阶段研究的目标是确定治疗性的效应,建立剂量范围和服药间隔时间,以及评估长期安全性和毒性。观察并确证药物的副作用和潜伏的AE。此外,在这一阶段研究将对药物的一些特殊效应进行评价和量化,如嗜睡性、拮抗等性质。

第三阶段研究还包括为该药物进行识别归类,找出最适当的总体或亚群。在每种治疗一类疾病的药物中,该药物可以发展为有效的替代药物,且在安全性上比已有药物好。所以,第三阶段临床将研究比较药物在其一类药物中的安全性。

在第三阶段临床实验中,需要进行药品相互作用的验证。在多数疾病中,越来越普遍使用药物配伍治疗,药物相互作用越有可能发生危险,这可以从药代动力学和药效学中看出。药品相互作用的可能性和半定量估计可以由体外数据推测出^[6]。药物的相互干扰,可以从新药对其他药

Y

物的药代动力学干扰,以及其他药物对新药药代动力学干扰两个方面加以研究。首先,人们通常依靠新药影响各种酶和中间载体的清除率过程。最特别的是,这与细胞色素P450 (CYP) 异型有关,但也可能包括共同酶类和载体,如 β -糖蛋白。如今,药物可能不需要作为CYP异型的底物,就是一个有效的抑制剂,如奎尼丁是一种CYP2D6抑制剂。

由于其他药物引起的潜在值得注意的药物相互作用,需要了解新药体内清除率和已知抑制剂被同时服用的可能性。由于药物给药的多途径和较广的疗效指标,可能会使相互作用研究受到限制。第三阶段的整体药代动力学分析数据可以有助于发现和量化药物之间的相互作用,因为每类药物常常相互抑制(如大环内酯类抗生素、全身性抗真菌药、钙通道抑制剂、氟西汀、帕罗西汀)或诱导(如抗惊厥药、利福平)。

大多数早期临床实验是在大学药物研究机构中由某个专业领域医生来进行的。然而,当药物研究市场化后,普通医师也可参与其中。因此,该领域的普通医师必须在第三阶段中了解和研究该药。因为他们可以通过具体用药看到临床医生列出的大部分处方的应用现象。同样,扩大药物发展的商业反馈价值,可能要进行一个多适应证研究策略(如果进入批准后阶段,有时会计划执行第五阶段)。此外,在第三阶段,进行国外的药物测试是可能的,但其他国家执行的管理制度可能不同于美国,使实施有些困难。

4. 第四阶段

虽然从第一阶段到第三阶段中所用的受试者是经过严格筛选得到的,但是第四阶段的研究重点在于大量地观察性探索,而不是前期的严格计划性研究。作为申请NDA的条件,需要在第四阶段进行市场上的监督和额外研究。

上市前临床实验数据采集是一种广泛而科学的研究过程。详细血样采集、特定试验以及认真的生理监测都是这些研究中的典型。然而,上市后的研究针对的通常是非常大的患者群体(5000~10 000或更多),从而不需要收集每个患者的所有数据,而更多强调安全性信息的采集。从并非一个研究计划中患者的AE报告可以补充这些研究内容。在第四阶段中,通过研究大量患者,更容易得到不寻常的AE,确定对在一定AE下相对危险的患者群体。例如,在人口统计倾向的负作用来看,包括地理位置、性别或种族等因素均可以在上市后的监督中得到。

确定程序需要考虑的因素

设计一项临床研究工作需要等到试验研究目的得到严格定义才可以开始。目的表述需要明确说明什么需要调查研究,其中不应含有含糊的语句^[7]。一旦得到一个毫无歧义的特定目的,科学家们将围绕这个目的,设计建立研究计划,开发和记录控制程序^[8]。其中必须考虑的是,当设计一项探索性研究时,将要涉及相互比较组的类型和数量。

一般而言,通过所设计的一个小组服药情况来评价药物,但是有时候需要几个组进行药效研究,一些组服用安慰剂,另一部分则服用有活性的药物,再与服用研究用药的小组比较。通过这样的设计,可以排除安慰剂效应的可能性,估计出研究用药与现在市场销售的其他同类药物相关的药物安全性。

在第三阶段的研究中,常常用到NDA(保密机制)来进行安慰剂控制的研究。安慰剂药物治疗应该尽可能与所研究的药物相似(色泽、味道和形状相同)。在不存在统计上的显著性差异情况下,比较安慰剂组和服用研究药物组之间的差异,可以得到研究药物的真实疗效。

像安慰剂一样,活性药物也要类似于研究用药物(色泽、味道和形状相同)。如果剂型不能完全相似(锭剂、乳浊液等),那么需要每种剂型的安慰剂,以使患者不能分辨出安慰剂和有效活性药物。在不存在统计上的显著性差异情况下,可以证明活性药物在已有的治疗效果范围内,与研究药物相比,并没有优势可言。然而,设计的服用活性药物组所有的更高AE发生率和相似疗效,却证明了研究的新药在现有的治疗效果中具有更大优势。

除了需要确定研究中设计到的组类型和数量外,还需要选择平行设计还是交叉设计。举例来说,在一个安慰剂临床实验中,平行设计就是在每个研究小组中均采用相同药物(安慰剂或活性药物)。在交叉设计中,每个小组均包括安慰剂和活性药物(例如,一个组可能先接受6周的安慰剂,然后接受6个星期的活性药物)。

交叉设计的优点是每个组可以自控,从而证实研究用药物在整个治疗中的疗效。但是缺点是从一个周期切换到另一个周期时,可能会存在残余效应。这样可能使疗效评价和安全评估在交叉设计中变得困难甚至不可能。避免残余效应的方法是在两个不同周期中插入一个冲洗周期。在冲洗周期内,患者可以在几天或几周内服用安慰剂或不进行治疗,从而使药效被“冲洗”掉。

平行设计的优点是避免了残余效应,因为每组只服用一种药物。相对于交叉设计而言,平行设计需要更多的患者,以具有统计意义。此外,虽然这种设计需要大量符合要求的患者,但是整个周期比交叉设计短。

交叉设计需要更长的时间周期,因为每组必须要经过活性药物服用和控制的研究药物服用的周期,其中研究药物服用周期可能更长,因为要等到可以看出药效为止。当插入冲洗周期时,整个设计的实施需要更长时间,以至于更多研究可能因此而停滞不前。此外,在交叉设计中,较少的样本得到的统计结果不能很好的说明作用。

一旦选择好设计类型,在记录临床程序时还需要注意其他一些事情,包括选择患者的依据、疗效确定方法、安全参数、临床试验中各类事件,包装和调剂等时间安排,以及知情同意书的格式等。此外,还要做到试验的双盲。在控制得较好的研究中,其设计都是采用随机程序,以消除偏袒的选择,整个样品变量的采样在每组中均有可比性,并且具有统计学意义^[9]。在双盲中,无论是患者还是具体

的研究人员,均不知道药物的发放情况。因此药物研究队伍需要在研究前设计并记录程序。

药物开发需要考虑的因素

药物的临床研究是为了更好地为患者服务。因为目前对致病机理和药物作用机理的了解还不够深入,所以评价药物疗效通常比较复杂困难。现在较多使用的是患者服用药物后通过间接手段来评价药效(如服用降压药物,观察血压是否下降)。当然,药物特征也可以用直接方法来评价。例如,测定血药浓度的药代动力学参数就是一种直接评价药物的方法。

类似于药效评价,评价药物安全性也是倾向于采用间接方法。其中的主要方法是从临床试验患者的 AE 报告中获取安全信息。虽然有很多精确的生化机理来解释 AE,但是仍不能直接进行评价,这也使间接评价药物的不良反应困难重重。因为临床评估基本上是一些间接方法,AE 报告常常会带来一些复杂问题。药物相关性或因果性程度、药物治疗效果、AE 的严重程度、疾病的复杂状态、其他临床条件影响以及疾病本身等都是很难确定的,特别是在药物研究的初期。此外,无论 AE 是否与药物相关,所有的临床研究过程中 AE 报告都会被记录并制成表格,建立数据库。这些包含在数据库内的信息将被用来生成数据包。

虽然临床药物疗效可能是药物研究中最关心的话题,但是也不排斥对药物生化、物化等方面性质和药物作用机理的了解。这些直接测定参数在药物研究中与间接测得的临床药效评价是平等的。如主要用于研究药物理化性质的药代动力学是生物制药学中的一个重要分支。药代动力学描述了药物吸收、分布、新陈代谢、排泄以及治疗时间或不良反应之间的关系^[10]。药效主要由血药浓度来确定。所以药代动力学的最终目的是描述时间与血药浓度的关系曲线,这与药物的疗效和不良反应紧密相关。

药代动力学可以用于指导剂量选择,因此,在给患者服药时,最好做到能够达到最好药效,但不会产生副作用。虽然药物最基本的药代动力学特性是在早期临床研究中确定的,但是许多影响药代动力学参数的因素需要通过药物研究以便为不同患者制定合适的剂量。因此,直接和间接的测定方法对于评价药物都是有用的。

市场研究

任何一个成功的药物公司都是把研究和销售有机结合的产物。因为一个有效的科学临床研究小组常常需要设计和完成实验,进行临床观察,以不断完善药物。对于市场而言,在利益上是一致的,市场销售也需要安全有效的药物为基础。因此,如果要获得成功,药物研究和市场投入都是必不可少的。

通过由临床医师得到的有关市场上各方面的需求,以及对其他厂家生产的新药情况了解,市场人员常常能够为

其新药研究同事提供一些有价值的建议。此外,市场专家还可以帮助鉴定其他公司已经生产和销售的药物,从而避免了人力物力的浪费。

因此,研究和市场这两方面在一个成功的药业公司中相互促进。市场部可以为临床研究人员提供有价值的产品信息和市场需求,而临床研究人员则可以为市场部提供关于药物研究的资料和建议,以便市场部的销售。

有效的全球计划

药物通常是全球化的,因此临床药物研究计划中所包括的一些全球化研究计划在一定程度上具有各自特定的难度。毕竟,在不同的国家,药物治疗的方法、指导原则以及整个文化氛围都是各不相同的,同时在不同的国家得到的结果可能也会存在一定差异。此外,一些国家的药物研究者可能比别的国家更加保守,这样用药剂量比较低。所以,在不同国家的标准中,研究人员得到的结果也是不同的。

另外一个导致全球性研究计划实施困难的原因是不同国家对早期临床治疗和药物安全性的认识不同。在一些国家,认为志愿人员和患者在观察上是不同的,这就使得第一阶段比其他几个阶段更容易得到受试者。而在美国,志愿人员与患者是同等的,因此需要得到 FDA 的许可才可以用志愿人员和患者来做研究。

此外,在新药研究的指导原则上,不同国家也不大相同。在英国,研究机构之间以及英国药物安全委员会不能进行有效的交流。缺少这种直接的交流机会,使研究机构不能做出客观的新药研发评价,也使医药企业在理解和处理国家指导原则时,将临床研究仅仅当成是例行公事,而不是作为一个药物发展关键环节进行处理。

在美国, FDA 制定了 CFR (Code of Federal Regulations) 来规范研究机构,以完成有效的临床研究。但是,有些临床研究因为其自身的特殊性,并不适合 FDA 制定的针对大部分药物的 CFR 规定,因此在这些研究实施前, FDA 必须确认所有的研究试验和方法在整个新药研发计划中是合理的,才会批准其进行。

从 20 世纪 90 年代开始, FDA 就在国际上积极参与如何协调药物发展的技术和指导原则工作。这种努力使得包括贸易、跨国医药公司、贸易联盟 (NAFTA、GAT、WTO 等) 都参与到药厂控制价格中来。其中,能控制价格的原因主要包括激烈竞争和安全系数控制。在各种相互制约的组织努力下,成立了一个国际性组织 ICH 来进行药品的注册管理。ICH 主要集中在三个地方完成技术要求方面的协调:美国、欧洲和日本。一些早期的 ICH 指导原则包括研究形式和内容^[12]、稳定性试验^[13]和毒理试验^[14]。FDA 也与 WHO 及其他国际组织建立了关于药品安全标准^[11]。

临床研究在全球化中变得更加复杂,同时涉及更多的学科。事实上,在许多跨国公司中,需要进行这样的研究



也是具有一定难度的。尽管不同国家有着不同的文化背景、医疗方案,但是在许多组织中,全球化药物研究发展和市场依然是至关重要的。一些成功的公司在执行全球化发展计划前,就开始针对不同国家制定临床研究计划。

民族因素

临床研究中没有什么能比医师和科学家们面对各个民族文化时引起的争执和情绪来得强烈。虽然临床研究得到的成果常常是多次试验的漫长过程,但是在制订计划时常常要注意每一步都不能出现不该有的对受试者不负责的行为。因为目前更多强调的是对人权的尊重^[15]。

由于希特勒时期,药物研究者的临床研究都是建立在残暴的基础之上,所以在纽伦堡公约^[16]中就写入了必须得到受试者的同意才可以进行临床研究。1964年,由WMA(World Medical Association)组织制定的赫尔辛基宣言^[17]提出,只有有资格的药物研究人员和医师才有权利指导临床研究。然而,直到19世纪30年代才得到真正的关注,威尼姆斯医师与患者签订合同,而在19世纪末期,那时的麻风病医师无须获得同意就可以开始实验^[18]。

1979年,关于如何理解民族性和保护人类权利指导的贝尔蒙特报告中提到使人类作为受试者应得到的权利合法化^[19]。在这个报告中,确定了明确的界线来鉴定生物药品研究和常规药品治疗,探索关于如何确定临床研究中利弊的标准确立。此外,还制定了适当的选择药物研究项目的基本指导原则,进一步定义了与受试者签订合同的详细内容。

美国的其他重要法律规定,包括FDA的IRB(Institutional Review Boards)^[20],进一步确定了如何保护人类研究项目中人的权利。IRB是临床研究开始前,独立委员会在审核临床研究项目的指导原则。委员会将衡量临床研究中的利弊,具有建议项目中内容更改的权力和否定权。在IRB中,必须由数量平衡的男女职工组成,并且每个人都主要涉及非科学领域(律师、牧师),并不得担任任何研究机构职务。

与人类研究项目相近的是非研究医疗事故中的常规患者。1973年,AHA(the American Hospital Association)出版了患者权利书^[21],其中规定医师必须向其患者说明治疗中可能出现的情况,患者应得到尽心的护理,患者有机会拒绝接受治疗以及患者的所有记录情况都必须处于保密状态。

另外,面对伦理学的临床研究科学家,特别是对安慰剂临床治疗的设计,存在很多争议。安慰剂的使用设计是为了让科学家确认是由于药物本身的作用而导致疗效,而不是来自心理作用。换句话说,如果安慰剂与实际药物药效相当,那么在统计上看就是相同的反应概率。而在这里是要区分安慰剂的效应和实际药物的作用。

防止主观上的安慰剂临床研究方法是采用随机选择法,这样就不会存在刻意的主观行为。而且,许多研究计划中

扩大了研究范围,以便项目进行中进行安慰剂组有机会服用实际药物,作为完整的最初设计研究扩充的一部分,或者用来选择其他替代治疗药物。在研究项目中可能会给这些受试者更多的经济补偿。

有时,研究药物具有未知的副作用,导致很多生化和生理学上的问题,而安慰剂药物没有这些现象。这就可能受到多方面的非议,因为单单从伦理角度来看,给患者服用未知药物是不合理的。当然,研究有活性新药的所有大量一手资料和精心护理可以减少伦理方面的压力。当然,最重要的还是患者完全理解整个研究过程并自愿参加。

近来,在伦理问题上受阻最多的是基因工程和生物技术。伦理舆论在药物和法律领域有着重要地位。因为,单纯的科学讨论是中立的,但是应用其技术却常常遭到舆论的反对。

综述

通过临床研究来评价一个新药需要很多人才的参与。医师拥有的临床用药知识和对患者的护理使其占据很重要的位置。科学家的参与是因为熟悉如何研究和建立方法。药剂师发挥沟通治疗和药物的作用。其他非科学专业人员也是不可缺少的,因为在各方面都会起到重要作用。

药品上市之前,对临床评价进行许多不同层次的详细审查。这些层次包括第一阶段的安全测试、第二阶段的药效评价和剂量确定、第三阶段的最大使用量范围研究和药物配伍影响、第四阶段的上市后监督。在第二阶段研究中,需要身体体格良好的受试者,第二阶段到第四阶段则需要患者在患者中进行研究。

研究设计在药物临床评价中占据至关重要的地位。在设计中将确定好安慰剂或活性化合物的使用控制方法以及采用公开、平行还是交叉方法。在许多研究中,患者将随机选择。

临床研究涉及的评价方法也包括间接评价药物的安全性和药效(如特定征兆),和直接评价药物如药代动力学及模型。此外,市场和药物研究的联系也是十分重要的,因为研究需要以市场为导向来确定目标。最后,全球性计划也是必需的,因为药物销售常常是全球化的,这就要涉及不同国家不同的注册要求。而ICH的全球标准注册方法对于企业来说不是一种很好的方法。

伦理的困扰使得临床研究人员常常面对各种法规来制定切实的临床计划实施。新药研究的目的是发明新的药物治疗疾病,而法规则要确定其中不得有违反伦理的做法。

虽然,传统药物仍占据主导地位,但是生物药物制品和基因治疗越来越显示其优势。此外,应用新的方法来实时收集和评价临床数据也可以帮助加快新药开发。

参考文献

1. Cato, A.; Cook, L. Clinical Research. The Clinical Research Process in the Pharmaceutical Industry; Matoren, G. M.,

- Ed.; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1984; 217—238.
2. Smith, R. V. Development of Clinical Scientists. *Drug Intell. Clin. Pharm.* 1987, 21, 101—103.
 3. Spilker, B. Monitoring a Clinical Trial. *Guide to Clinical Trials*; Lippincott-Raven; Philadelphia, 1996; 430—448.
 4. Burley, D. M.; Glynn, A. Clinical Trials. *Pharmaceutical Medicine*; Burley, D. M., Binns, T. B., Eds.; Edward Arnold; London, 1985; 18—38.
 5. Edler, L. Statistical Requirements of Phase I studies. *Onkologie* 1990, 13, 90—95.
 6. Bertz, R. J.; Granneman, G. R. Use of In Vitro and In Vivo Data to Estimate the Likelihood of Metabolic Pharmacokinetic Interactions. *Clin. Pharmacokinet.* 1997, 32 (3), 210—258.
 7. Cato, A. Practical Insights on Designing the Correct Protocol. *Concepts and Strategies in New Drug Development*; Praeger Publishers; New York, 1983; 82—87.
 8. Spilker, B. Part II: Developing and Writing Clinical Protocols. *Guide to Clinical Trials*; Lippincott-Raven; Philadelphia, 1996; 145—272.
 9. Friedman, L. M.; Furberg, C. D. Basic Study Design. *Fundamentals of Clinical Trials*; PSG Publishing Co., Inc.; Littleton, MA, 1985; 35—38.
 10. Gibaldi, M.; Levy, G. Pharmacokinetics in Clinical Practice I. Concepts. *JAMA* 1976, 235, 1864—1867.
 11. Horton, L. R. Harmonization, Regulation, and Trade: Where Do We Go from Here? [editorial]. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 1996, 50, 61—65.
 12. Cocchetto, D. M. The Investigator's Brochure: A Comparison of the Draft International Conference on Harmonisation Guideline with Current Food and Drug Administration Requirements. *Qual. Assur.* 1995, 4, 240—246.
 13. Haase, M. Stability Testing Requirements for Vaccines: Draft Guidelines of the International Conference on Harmonization. *Dev. Biol. Stand.* 1996, 87, 309—318.
 14. Purves, D.; Harvey, C.; Tweats, D.; Lumley, C. E. *Genotoxicity Testing: Current Practices and Strategies Used by the Pharmaceutical Industry*. *Mutagenesis* 1995, 10, 297—312.
 15. Levine, R. J. *Ethics and Regulation of Clinical Research*; Urban & Schwarzenberg; Baltimore, 1981.
 16. The Nuremberg Code. *JAMA* 1997, 276, 1691.
 17. World Medical Association Declaration of Helsinki; Recommendations Guiding Physicians in Biomedical Research Involving Human Subjects, Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964 and Amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989, and the 48th General Assembly, Somerset West, Republic of South Africa, October 1996.
 18. Lock, S. Research Ethics: A Brief Historical Review to 1965. *J. Intern. Med.* 1995, 238 (6), 513—520.
 19. Department of Health, Education, and Welfare. The Belmont Report. Ethical Principles and Guidelines for the Protection of Human Subjects of Research the National Commission for the Protection of Human Subjects of Biomedical and Behavioral Research April 18, 1979. Available at: <http://ohsr.od.nih.gov/mpa/belmont.php3> (accessed March 2, 2001)
 20. Food and Drug Administration Information Sheets. Guidance for Institutional Review Boards and Clinical Investigators; 1998 Update. Available at: <http://www.fda.gov/oc/oha/IRB/toc.html> (accessed March 2, 2001) .
 21. American Hospital Association. A Patient's Bill of Rights. First adopted by the AHA in 1973. revision approved October 21, 1992. Available at: <http://www.aha.org/resource/pbillofrights.asp> (accessed March 2, 2001) .

(吴小虎 陈阳 译)



药物的生物合成

Geoffrey A. Cordell

Kyung Hee Lee

University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois, U. S. A.

生物合成和生物发生

当生物体系合成其要素时，通过一系列的代谢途径进行。经实验方法确定，生物合成（biosynthesis）是通过实验确定的次生代谢产物的形成途径；当缺少实验证据时，使用生物发生（biogenesis）这个术语。

次生代谢产物

对于生物体的生殖功能（呼吸和分解代谢）来说是必需的反应产物，称为初级代谢产物（primary metabolite）；而可生成其他功能的产物，则被称为次生代谢产物（secondary metabolite）。这类化合物通常能表征一个或一群生

物体的特点。该研究称为化学分类学。因此，次生代谢产物的生物合成途径不是随意的，而是高度专属的。因而，一个特定的植物属可产生大量的某种特定类型的代谢物（如苦木科中的苦木苦味素），而其他种属产生完全不同的代谢物（如夹竹桃科中的单萜吲哚生物碱）。

前体

以乙酸盐、莽草酸、异戊基焦磷酸盐和少量氨基酸为主的一组精选的初级代谢物，导致了次生代谢产物的多样性；135 000种不同植物来源的次生代谢产物，可分为12个大类（图1）。这里讨论的仅仅是一些具有社会或经济意义的生物活性物质。

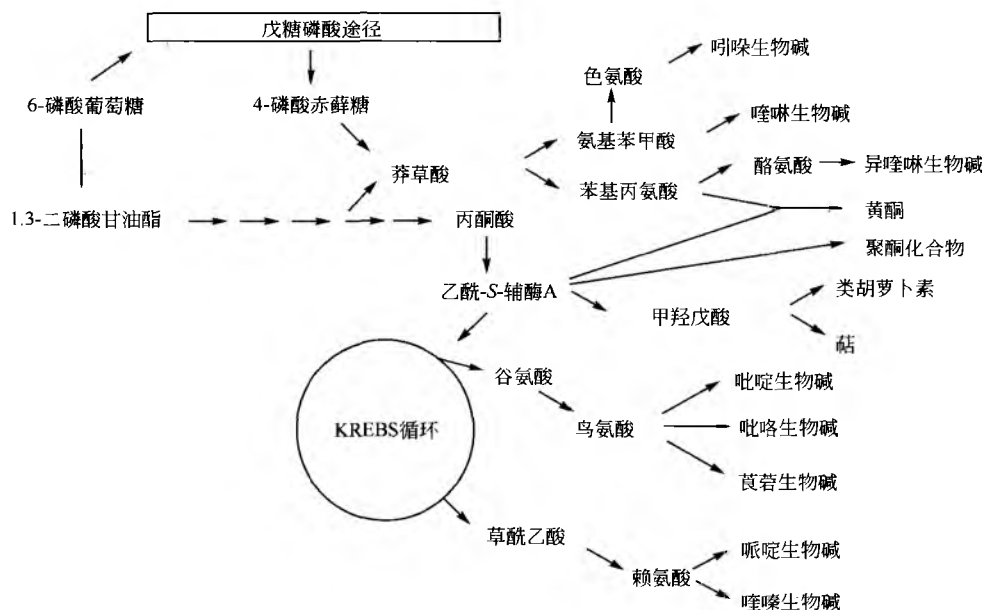


图1 次生代谢产物的生物合成源

生物合成的意义

生物合成是天然产物化学不可分割的和必要的领域，随着生物技术的发展，最近表现出高度的学术和商业意义。它是构建体系化、合理化框架的基础，可使多样的哺乳动物、节肢动物、昆虫、植物、微生物和海洋结构多样性的次生代谢产物有序化；在已有的生物合成方案的基

础上，通过生物发生的可能性，生物合成成为新代谢物提供了结构线索，并且使得利用代谢物的生物工程技术增加产量，或为获得更大的经济效益而改变预期的产物结构得以实现；在遗传水平上的操作可为未来的药物开发提供大量的新代谢物；最后，满足人类认识生命系统是如何产生次生代谢产物的好奇心。在酶或基因水平，改变病理状态的哺乳动物的该过程，对于疾病的治疗可能具有非常重要的意义。胆固醇合成抑制药物，如洛伐他丁就是一个例子。



生物合成的方法

当对不同的次生代谢产物分类的需要越来越迫切时,生物起源理论便出现了。当可以使用放射性同位素及后来的稳定同位素标记的前体出现时,可以用生物合成实验验证假设。生物合成着重研究合成路径中前体关系(包括特定过程的立体化学)和简单合成步骤中的酶。一个典型的实验包括当生物体正活跃产生目标代谢产物时,将标记的潜在前体进入生物体体内。在适当的时间之后,处理生物体,定位测量目标产物和同位素含量。利用碳和氢的放射性同位素(^{14}C 和 ^3H),确定大多数天然药物的生物合成路径。现在大量运用天然产物中重要原子的稳定同位素,如 ^{13}C 、 ^{18}O 、 ^{15}N 和 ^2H 。

对天然药物结构复杂性进行评估,结合先前的生物合成知识,经常引发对必需的化学转化的合理性回顾。这可能导致酶的分离和涉及非预期中间体。考虑到代谢系统的多样性,虽然这些路径常常被保存下来,但是不能假定在不同的生物体里通过相同的生物合成途径合成相同的化合物,即不同植物属间进行比较。

当存在介导代谢反应的酶系统且有活性时,前体必须到达合成的场所,才能确保生物合成反应有意义。在特定的生物体和不同生物体生长周期的不同点上,次级代谢的反应速率是不连续的。因此,如果要避免降解的话,确定生物体服用前体物质的时间非常关键。即使已知有机体在给药时可以产生次生代谢产物且使用了已知的前体,转运和渗透因素仍可能导致非常低的结合。使用整株植物或者愈合组织进行研究时,将前体转运至合成的位点非常重要。对于微生物,可能出现代谢降解,因为细胞群的生长常常领先于次生代谢产物的形成。

1. 放射性同位素的应用

虽然通过结合,一个简单的放射标记足以证明初步的前体关系,不过采用包含两个不同的战略位置标记点的前体是更好的。有两种类型的实验:①两个标记的前体进行物理混合并监控标记物比例,如 $[2-^{14}\text{C}, 4-^3\text{H}_2]$ -甲羟戊酸的输送实验即为一例;②使用在同一分子上有两个标记的前体, $[1, 2-^{13}\text{C}_2]$ 醋酸纤维素的使用是一例。双或多标记底物可以用于检查成键和断键反应,如果前体是立体标记(如 $[4\text{R}-^3\text{H}]$ -甲羟戊酸),且选择性地保留在底物中或标记存在于产物中的话,还可以检查酶作用的立体特异性。区别亚甲基或甲基团的前手性氢在技术上是可行的。

2. 稳定性同位素的应用和检测

用于生物合成研究的一般性的稳定性同位素有 ^{13}C 、 ^2H 、 ^{15}N 、 ^{18}O 。在许多生物合成研究中稳定性同位素标记的前体已经取代了放射性标记的前体,原因如下:①没有合适的放射性标记同位素可用(如N和O);②检测方法经常只能探测到直接标记的产物的位置;③减少了放射性污

染和安全性问题。稳定性同位素研究的不足包括:①检测方法相对不敏感(需要比较高的结合率);②前体中需要有更充足的标记;③需要相当数量价格昂贵的前体。

质谱和核磁共振是检测稳定性同位素的主要方法。质谱的优势是只需少量样品就可以结合,而核磁共振可直接确定标记位置。

3. 前体的给药

如果观测的体系是微生物体系,如组织培养基中的植物或无细胞系时,前体可以直接给药。如果要得出有意义的结论,就必须了解目标产物形成随时间变化的情况,以便有产物形成时给予前体。当使用完整的植物时,前体给药就比较困难;可通过茎秆毛细管作用输送,根、离体叶输送,甚至直接注入茎。

4. 中间体检测

生物合成中一项有挑战性的工作就是最后确立潜在中间体在生物合成路径中的作用。通常因为随后的酶(促)反应缓慢,造成了中间体的积聚。生物体也可以产生不能进一步代谢的旁路代谢物,不参与主要的代谢途径;这些产物也会积聚。因此即使分离出中间体,也不能确立中间性。有时可以用捕集(trapping experiment)解决这些问题。在路径 $\text{A} \rightarrow \text{B} \rightarrow \text{C}$,已知A是C的前体,同时给予标记的A和不标记的B。后者代谢为C而由前者产生标记的B;B可被暂时分离出来。另一种获取微生物代谢产物的方法是使有机体产生变异或加入特殊的酶抑制剂。这也可能造成中间体积聚。将一种标记的可能的中间体结合到产物中,并不能证明中间体依赖于主要的生物合成途径。它可能只是生物合成途径中所使用酶的一种底物。只有在合成路径中的每一种酶都得以分离和定性,且其底物特异性也得到充分的了解的情况下,合成途径中的中间体才能确定。

5. 酶和基因

生物合成途径的特点是受酶的控制且具有高度的立体特异。对重要的天然产物的合成步骤,人们已经了解得比较透彻,与之相比,几乎没有酶得以分离并标识,而能被克隆和表达的则更少。将来,在越来越多的生产系统中表达不同种类的酶具有非常重要的意义,这些酶将用于已知的和新的代谢产物的生产。

生物合成化学家的一个设想是在固体支持物上建立一个固定化酶系统(system of stabilized enzyme),允许从前体到产物形成一个持续的生产过程。不受气候和土壤环境的影响,产量将得到整体控制并具有重现性,产物提纯工作会大大简化,甚至不需要进行。随着生物合成路径中更多酶得以分离、定性、克隆和表达,这一设想正在逐步实现。在有机合成中,酶系统在直接的立体特异性反应中的运用呈现急剧性上升趋势,有效性和对映选择性也相应增加。

6. 组合生物合成

生物合成方面的另一个梦想是预先调控生物体产物性

质的能力。在微生物和植物组织培养领域,可通过改变生长介质,或用化学或其他外部试剂(如真菌)刺激生物体,从而产生应激代谢物(异种化感物)。在多聚乙酰领域,通过选择性地改变生物合成途径基因序列的更易改变其代谢作用。在组合生物合成领域,众所周知该方法可为化学分析或生物评价形成新的化合物。

来源于乙酸盐的化合物

乙酰辅酶 A 是两个 C 的结构模块——乙酸盐的生物合成活性形式。它在哺乳动物、植物、微生物生化方面具有非常重要的意义,经由乙酰辅酶 A 可得脂肪酸、多聚乙酰,并可经甲羟戊酸制得萜烯。

1. 脂肪酸的生物合成

一般的脂肪酸,如棕榈酸(C_{16})、硬脂酸(C_{18})、花生四烯酸(C_{20})等,有偶数个碳。它们的碳链形成过程最初包含了乙酰辅酶 A 和二氧化碳的一个反应,得到化学活性更强的丙二酸单酰辅酶 A,其已经缩合了第二个乙酸盐单位。随后二氧化碳失去的正是其得到的那一个碳。这种特异性允许使用 $[1, 2-^{13}C_2]$ 乙酸盐相关的实验得以进行。随着脱水和顺式石蜡还原为饱和脂肪酸, β -羰基也得以还原。反应重复进行,每次使得碳链延长两个碳单位(图 2)。通过脱氢作用也能得到不饱和脂肪酸,如油酸到花生四烯酸

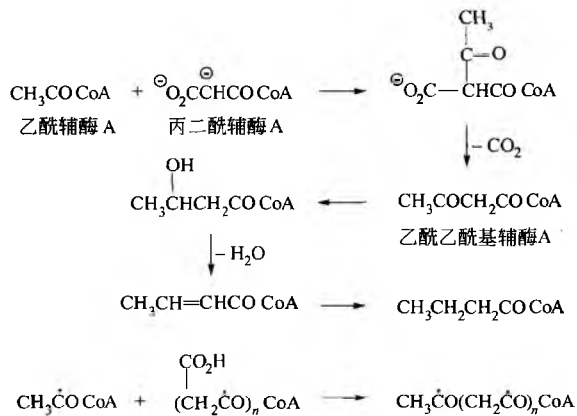


图 2 脂肪酸的生物合成

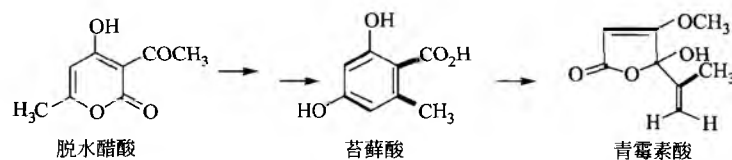


图 4 青霉素酸的生物合成

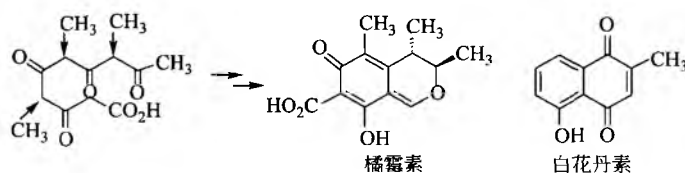


图 5 橘黄素的生物合成

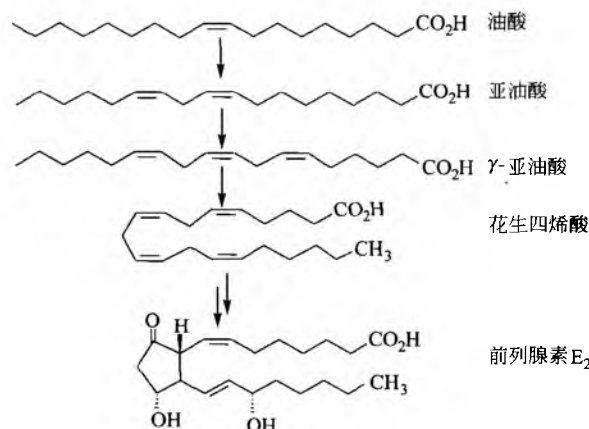


图 3 前列腺素的生物合成

的转化。后一化合物是前列腺素的前体(图 3)。脂肪酸的支链可以产生于初始酸,或者通过对先形成的脂肪酸进行酰化作用,还可以通过烯烃中间体和甲硫氨酸的反应产生。

2. 多聚乙酰途径

芳香族化合物主要通过莽草酸(见下文)或多聚乙酰途径形成。1893年,Collie首次提出多聚乙酰路径,Brich从理论(乙酸盐假说)和实验上对其进行了扩展。造成产物多样性的因素包括链引发单元,成环的单元数,独立形成的多聚乙酰之间的缩合反应及次级过程,如烷化或卤化。中间链的 1, 3-二酮性质导致了醚或酚基团之间特征性的间位关系,而在源于莽草酸的代谢物中,这些基团为典型的邻位关系。

青霉素,一个简单的丁烯酮(tetraketide),经采用 $[1, 2-^{13}C_2]$ -乙酸盐的实验(图 4)证实,其芳香环是开裂并环化的。另外,戊烯酮橘霉素(pentaketide citrinin)是直链多聚乙酰环化的结果,从甲硫氨酸中引入了三个甲基(图 5)。己烯酮衍生物稀少。萘醌篮雪酮是去羧基后环化得到的。灰黄霉素是一个庚烯酮(图 6),在早期证明了 Birch 乙酸学说的正确性。蒽醌,如岛青霉素(islandicin),是辛烯酮衍生物(octaketide);可通过 $[1, 2-^{13}C_2]$ -乙酸盐区别多聚乙酰链两种不同的环化类型。通过醌环的氧化断裂、环化和脱羧可得夹氧杂蒽酮(图 7)。

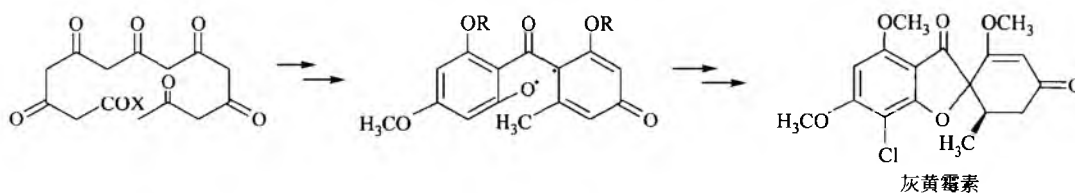


图6 灰黄霉素的生物合成

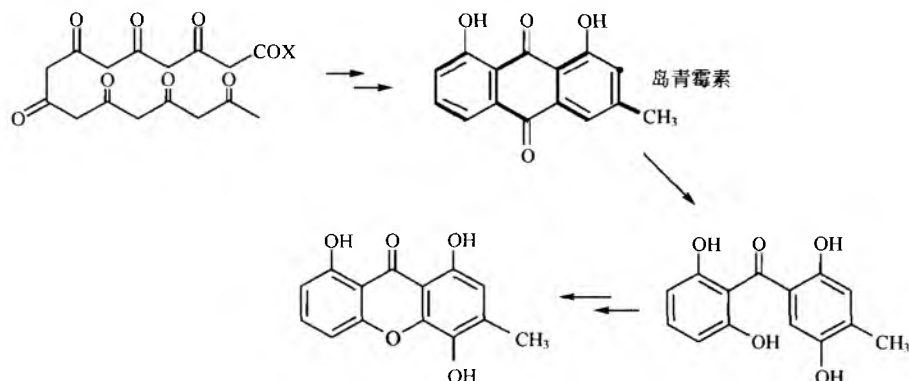


图7 蒽醌和占吨的生物合成

最有临床意义的多聚乙酰化合物是链霉菌培养基里产生的碳疽环酮和四环酮。四环素证明链起始位点能是一个丙二酰胺单元，还能证明在初始的芳香环化后会出现更多的反应（图8）。混合的生物合成在大环内酯类抗生素中是显而易见的，乙酸盐和丙酸盐结合成链（如泰乐菌素和制

霉菌素），或者仅仅丙酸盐（如红霉素），并环化成不同大小的环。几种植物来源的蒽醌具有临床意义，包括番泻树的番泻苷（狭叶番泻）、芦荟中的芦荟素（库拉索芦荟及相关的种类）、波希鼠李皮的药鼠李苷（鼠李属）、圣约翰草的金丝桃素（金丝桃属）（图9）。

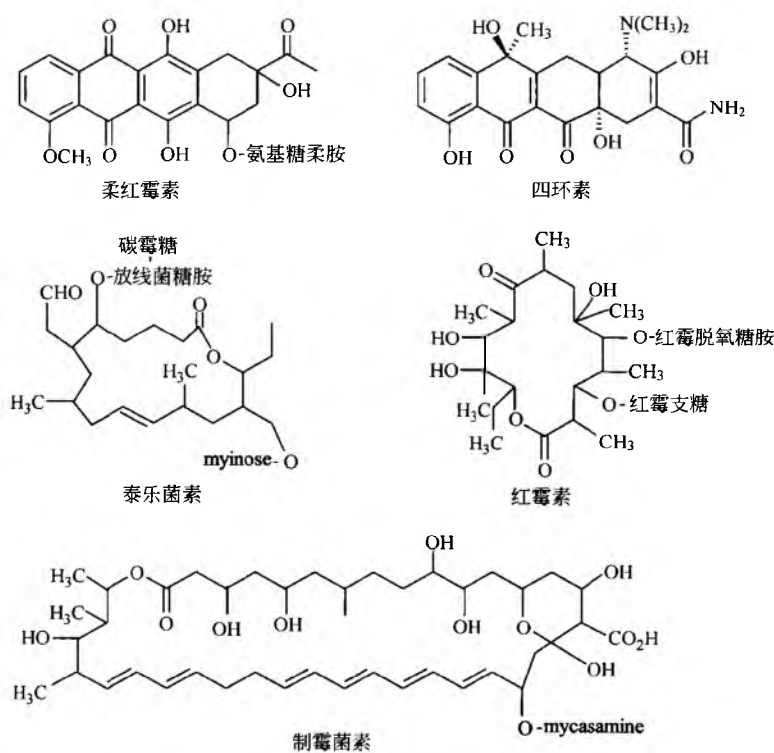


图8 代表性的聚酮抗生素

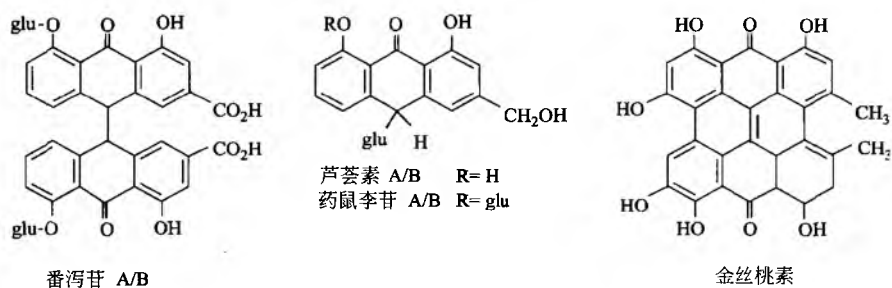


图9 代表性的植物来源的蒽醌

3. 莽草酸途径

包括大部分生物碱在内的多数芳香族化合物是通过莽草酸途径得到的。在分支酸的支点上，形成了色氨酸的前体维生素L或者苯基丙氨酸〔其本身是酪氨酸和多巴（3，

4-二羟基苯丙氨酸）的前体〕的前体预苯酸（图10）。经3位磷酸化，与磷酸烯醇丙酮酸盐缩合并消去磷酸，从莽草酸得到分支酸。分支酸是许多简单且重要的芳香族化合物的前体，包括水杨酸、4-氨基苯甲酸（PABA，构成叶酸的要素）、2，3-二羟基苯甲酸（肠菌素的关键酰化基团）。

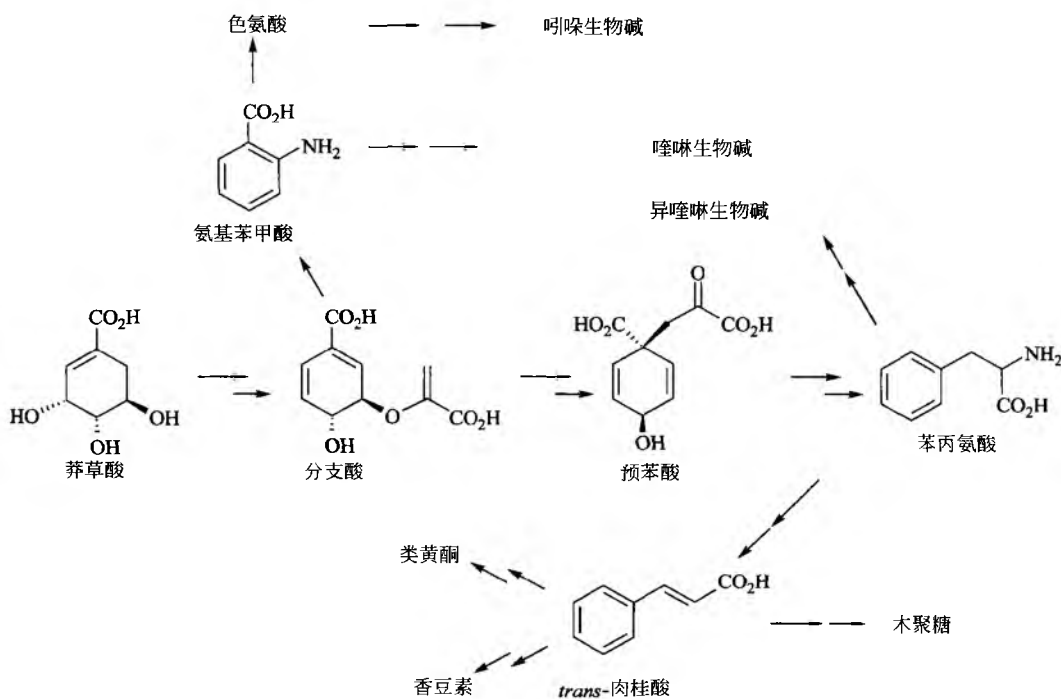


图10 莽草酸来源的化合物的关系

2位的氨基化和丙酮酸盐的脱去得到芸香科植物喹啉类生物碱的前体——邻氨基苯甲酸和吲哚生物碱的前体色氨酸（图10）。分支酸内部的 Claisen 重排经由预苯酸产生苯丙氨酸。在苯丙氨酸经羟基化生成酪氨酸的过程中，在C-4'位有一个特征性的 NIH 质子转移（图11）。进一步

的羟基化得到可用于治疗帕金森病的多巴。多巴能氧化并聚合产生头发、皮肤和眼睛色素的黑色素。分支酸的4'位氨基化，并经 Claisen 重排和氨化可产生4'-氨基苯丙氨酸，是氯霉素的前体（图12）。

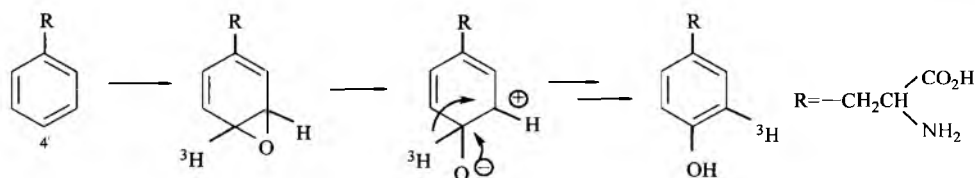


图11 苯丙氨酸4'-羟基化的 NIH 转移

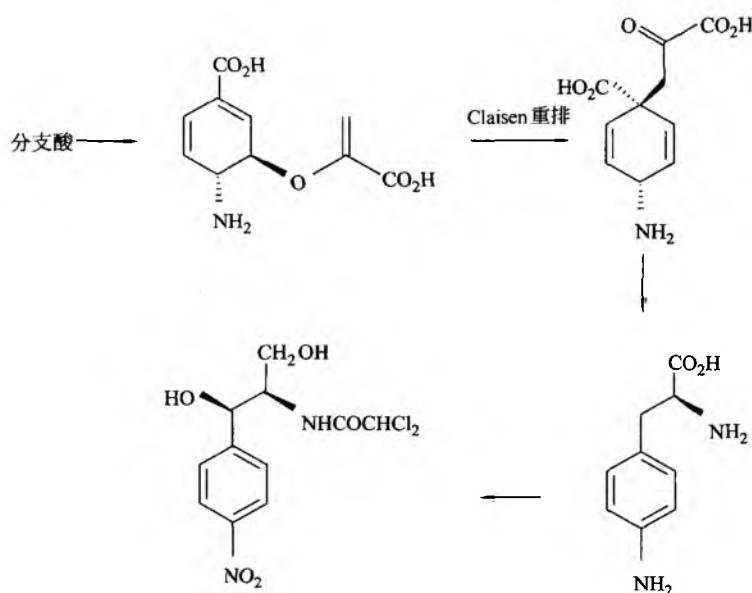


图 12 莽草酸来源的代谢物

在苯丙氨酸脱氨酶 (PAL) 的作用下, 苯丙氨酸通过氧化脱氨和 4 位羟基化, 提供了香豆酸, 其衍生物为木脂素和木质素类的基本结构框架, 如强效的抗癌药鬼臼毒素

就是木质素的一种 (图 13)。后者是依托泊苷和替尼泊苷两种药物的模板。

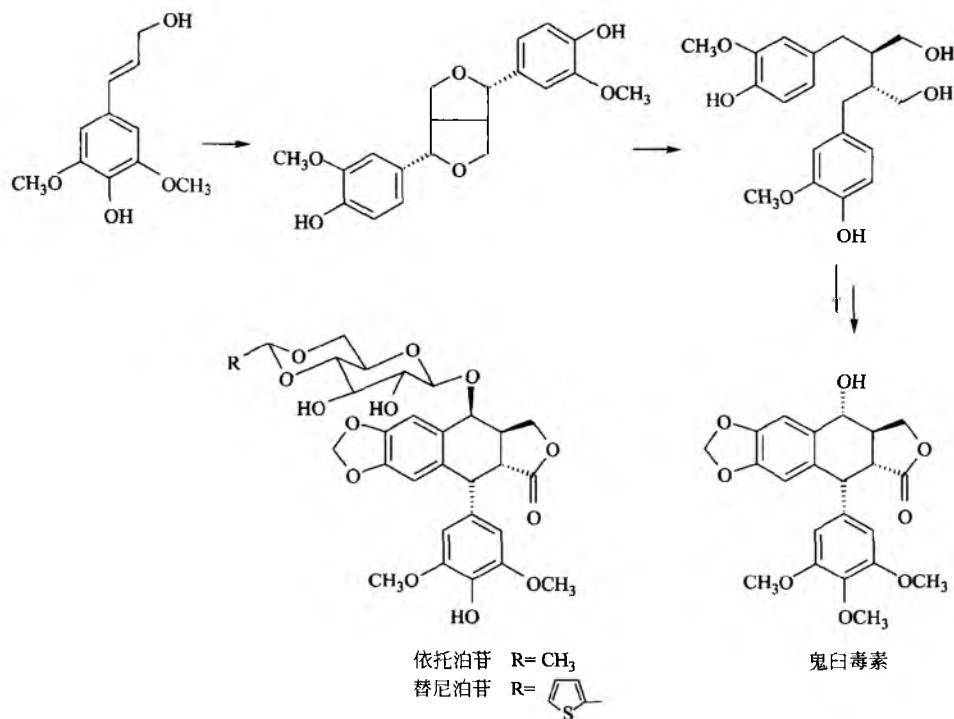


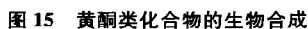
图 13 木聚糖的生物合成

对香豆酸的双键发生光学异构作用并生成内酯后, 发生了 2 位羟基化, 生成 7-羟 (基) 香豆素 (伞形花内酯)。6 位发生异戊烯化、环氧化、环化和逆醛醇缩合反应 (retro-aldol reaction) 生成呋喃氧杂萜邻酮 (图 14); 其中一些

(如补骨脂内酯和佛手柑内酯) 可作为光敏剂用于治疗白癜风和牛皮癣。香豆素可刺激网状内皮组织系统, 还能用作抗凝血药物, 如双香豆素和华法林的模型。



黄烷醇和山奈酚(图 15), 后者经常同槲皮(黄)素(3'-羟基山奈酚)一样分布广泛。由于黄酮类的体外活性, 人们对饮食中的黄酮类化合物产生了极大的兴趣。水飞蓟(牛奶蓟)在欧洲作为一种抗肝毒素剂应用于蕁中毒, 其活性成分是水飞蓟素(黄酮木脂素混合物)。



雌激素活性,将来可能用于治疗激素依赖性的乳腺癌。因为具有杀虫和细胞毒活性,鱼藤属和灰毛豆属种的拟鱼藤酮(如毒鱼藤素)受到了广泛的关注。

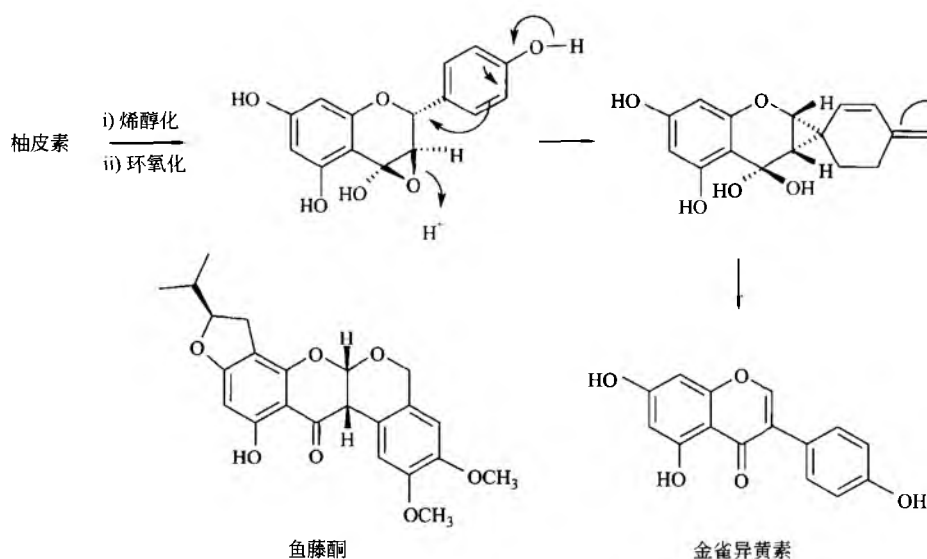


图 16 异黄酮类化合物的生物合成

来源于异戊烯焦磷酸的化合物

许多天然产物包含来自萜前体的单元。这些化合物由

包含 5 个碳的异戊二烯为单元组成，分别叫做半萜 (C₅)、单萜 (C₁₀)、倍半萜 (C₁₅)、二萜 (C₂₀)、二倍半萜 (C₂₅)、三萜 (C₃₀) 和四萜 (C₄₀)。连续的单元通过头-尾 (如法呢醇) 或尾-尾 (如鲨烯) 连接。来源于甲羟戊酸

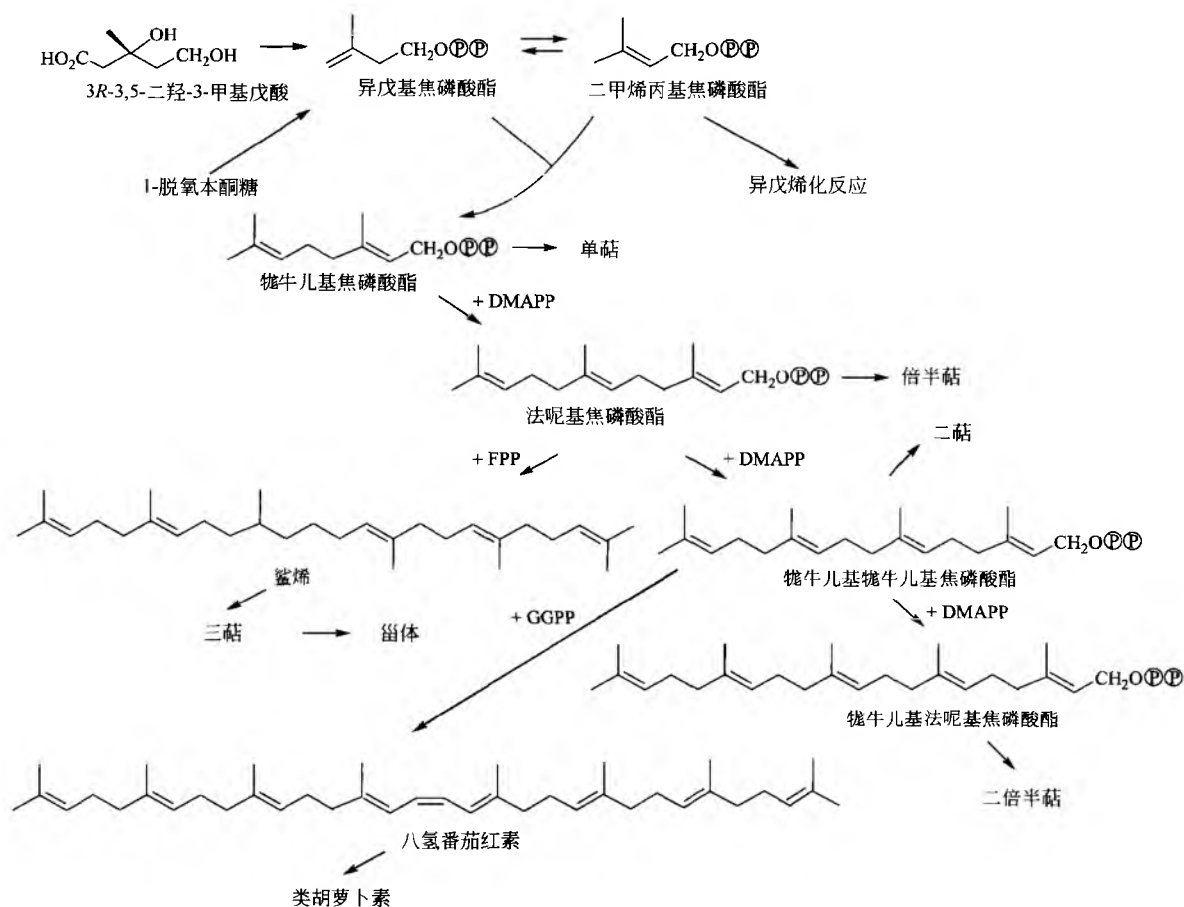


图 17 异戊二烯来源的化合物的关系

或 1-脱氧木酮糖的异戊烯焦磷酸 (IPP), 异构化得到二甲基丙烯焦磷酸酯 (DMAPP), 同时它本身也是链的延伸单元。图 17 显示这些萜烯之间的关系以及如何从一个三萜前体制得类固醇。这些代谢物的构象和形成是很普遍的, 许多衍生物对哺乳动物的功能是必需的 (如胆固醇、类固醇激素、胆酸、维生素 D 和维生素 A)。

香叶醇是最原始的单萜, 许多植物的油中含有其简单

的衍生物和环化产物, 可以作为香料和芳香剂 (如鱼追蒿、茺荑、茛苳、桉树、薰衣草、橙、欧薄荷、玫瑰、檀香) 使用, 也可药用 (如樟脑、薄荷脑), 还可作为杀虫剂 (如除虫菊酯) 使用。将链延长得到法呢醇, 可以二聚为鲨烯或经过自身分子改变产生不同的倍半萜。其中之一如艾属科 (黄花蒿) 的青蒿素, 作为抗疟剂具有重要意义, 另外如 (一)-棉酚, 是一种男用避孕药 (图 18)。

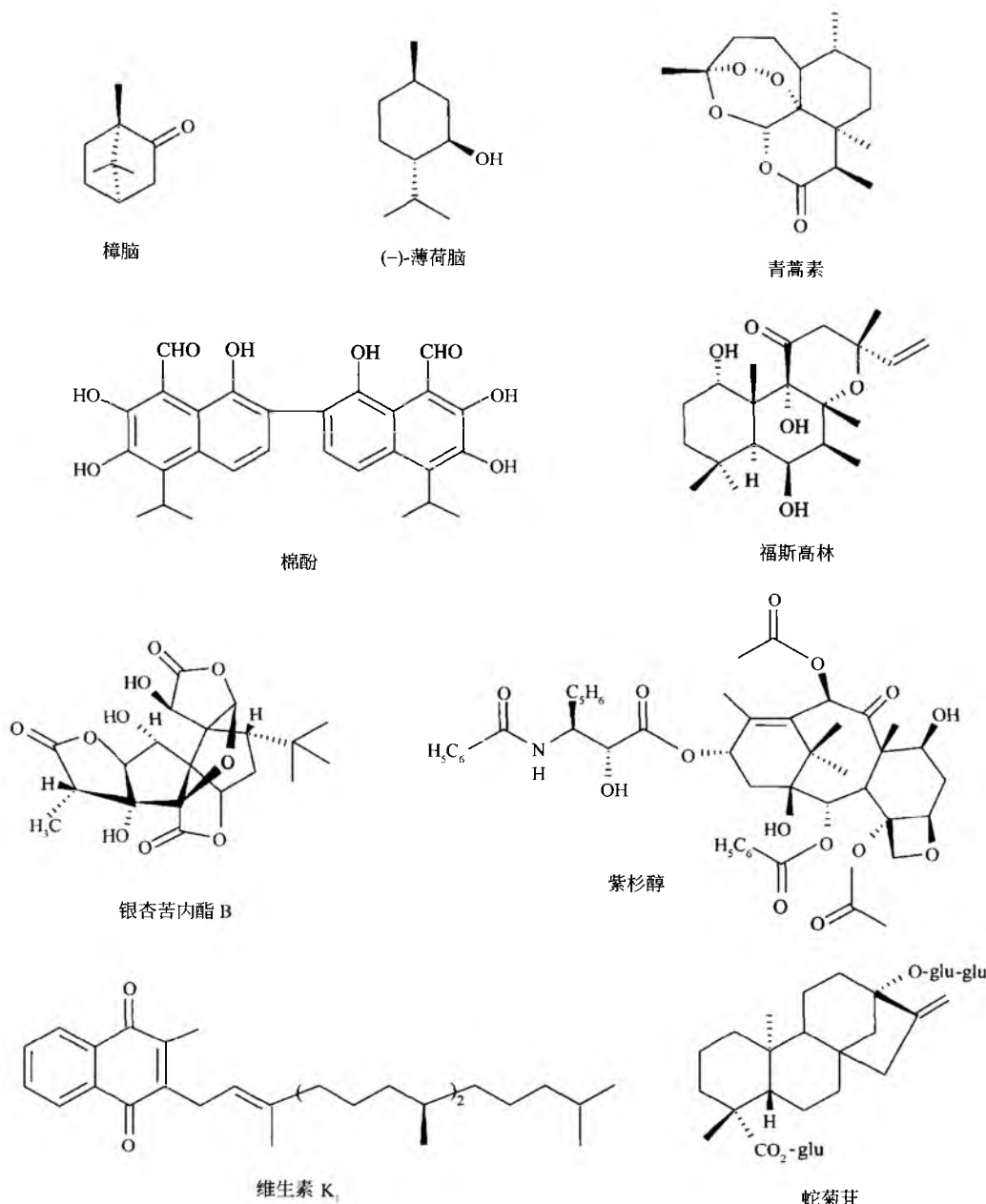


图 18 代表性的单萜、倍半萜和二萜衍生物

一些双萜衍生物是商业上重要的药物。福斯高林, 来源于印度的药用植物锦紫苏, 是有效的腺苷酸环化酶抑制剂, 有望用于充血性心力衰竭和支气管哮喘的治疗。来源

于银杏的叶子的萜内酯, 是有效的血小板活化因子抑制剂, 与特定的黄酮类化合物混合, 可改善外周和脑血管功能, 因此, 它们广泛用于阿尔茨海默病和记忆丧失的治

疗。紫杉醇，最初分离于紫杉（短叶紫杉属），能够用于治疗包括卵巢癌和乳腺癌在内的多种癌症。它通过促进微管装配发挥作用（可与鬼臼毒素、秋水仙素、长春新碱相比）。在叶绿素 A 和维生素 K₁ 的侧链上发现了牻牛儿基牻牛儿基单元。许多大戟属植物种类乳液中包含了巴豆萜烷酯，具有强烈的皮肤刺激性和致癌性。对映贝壳杉烯醇（斯替维苷、甜叶菊苷）的衍生物是非生酮甜味剂。

鲨烯氧化物在动物和真菌里通过一系列的环化，得到

羊毛甾醇，在植物里得到环阿乔醇（图 19）。在上面的两个路径中，中间体均为原甾醇阳离子，它能经历一系列 Wagner-Meerwein 重排得到细胞毒性的甜瓜和黄瓜的葫芦素。椅-船-椅-船式构象的鲨烯氧化物可以产生达玛脂浸质阳离子，皂苷中众多的三萜骨架的母系（如羽扇烷、齐墩果烷、乌苏烷、蒲公英赛烯）存在于多种食物、肥皂和保健食品中的几种药物（如人参、甘草、柴胡和欧洲七叶树）中。

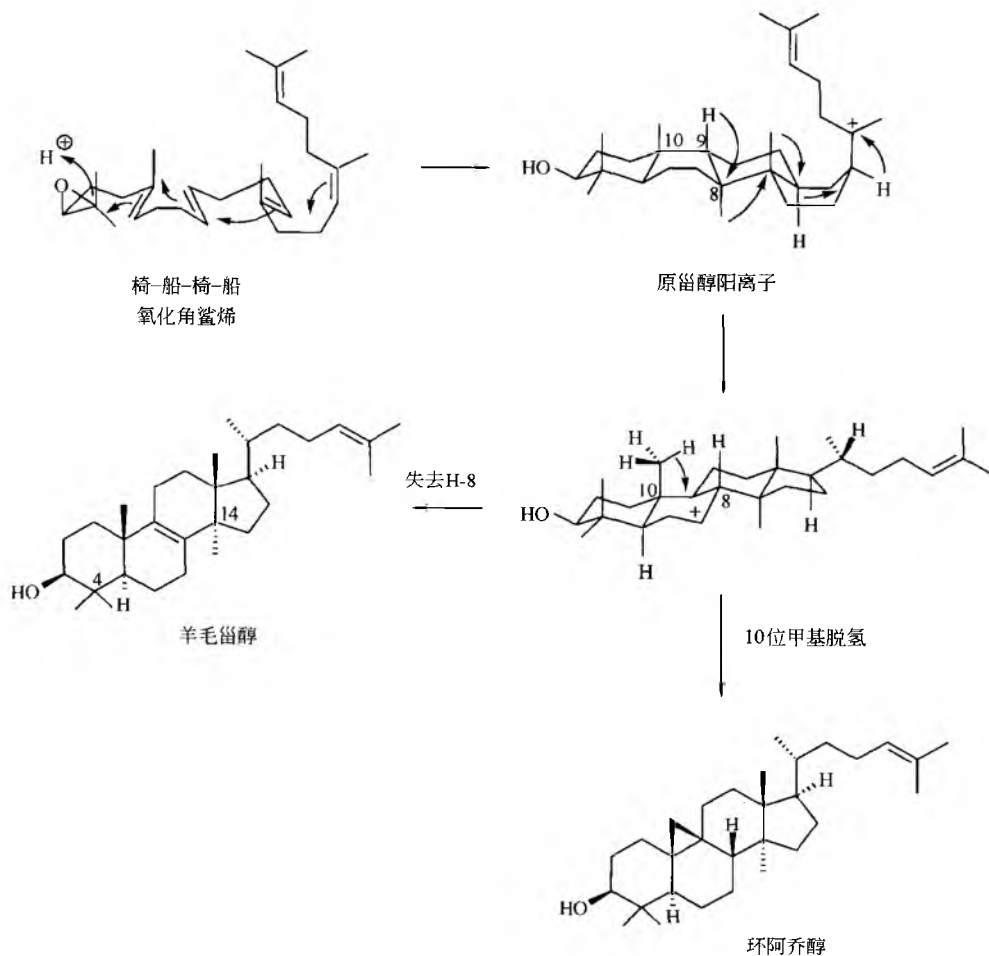


图 19 羊毛甾醇和环阿乔醇的生物合成

类固醇是降解的三烯衍生物，根据含碳数目分为不同的核。从药用角度来说，最重要的是胆烷、孕烷、雄甾烷、雌甾烷系统。当核失去一个碳原子（如一个甲基）时，就使用 nor 这个术语。

在动物体内，羊毛甾醇经历一系列的降解步骤（图 20），其顺序取决于生物体，得到胆固醇。在光合成生物体内，环阿乔醇起到了这个作用，环阿乔醇的环丙烷环是打

开的。胆固醇几乎存在于每一个动物组织中，得自牛脑和脊椎，羊毛脂取自羊毛。血液胆固醇浓度越高，心脏疾病和动脉粥样硬化的危险性就越高（胆固醇及其酯在动脉壁上沉积）。因此，能选择性抑制胆固醇合成早期（HMG-CoA 还原酶）的药剂，如莫维诺林（洛伐他丁），能有效降低血浆胆固醇水平。

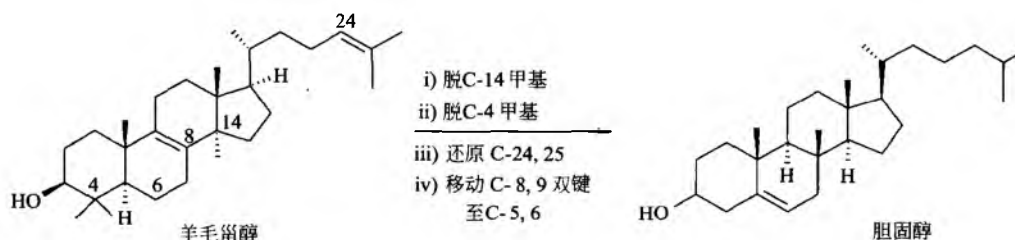


图20 哺乳动物体内羊毛甾醇转化为胆固醇的步骤

主要基于 C_{27} 甾醇核的甾体皂苷，分布于薯蓣科植物、龙舌兰科和百合科，在C-22有螺酮缩醇（如薯蓣皂苷元）。它们的特征还包括在C-3位结合了大量的糖单元，有时其他位置也会结合。虽然不是药物，甾体皂苷对于重要的激素（雌激素、雄激素、孕激素）和选择性的抗剂的半合成非常重要。例如，薯蓣皂苷元转化为妊娠双烯醇酮乙酸

酯后，可以继续转化为激素（黄体酮、睾酮、雄烯二酮、雌酮）和皮质激素。微生物转化在几种反应序列上是重要的。人参皂苷，高丽参（*Panax ginseng*）调理作用的主成分，都是三羟基（ 3β , 12β , $20S$ ）达玛烷的多糖衍生物，糖变化出现在C-3和C-20位（图21）。

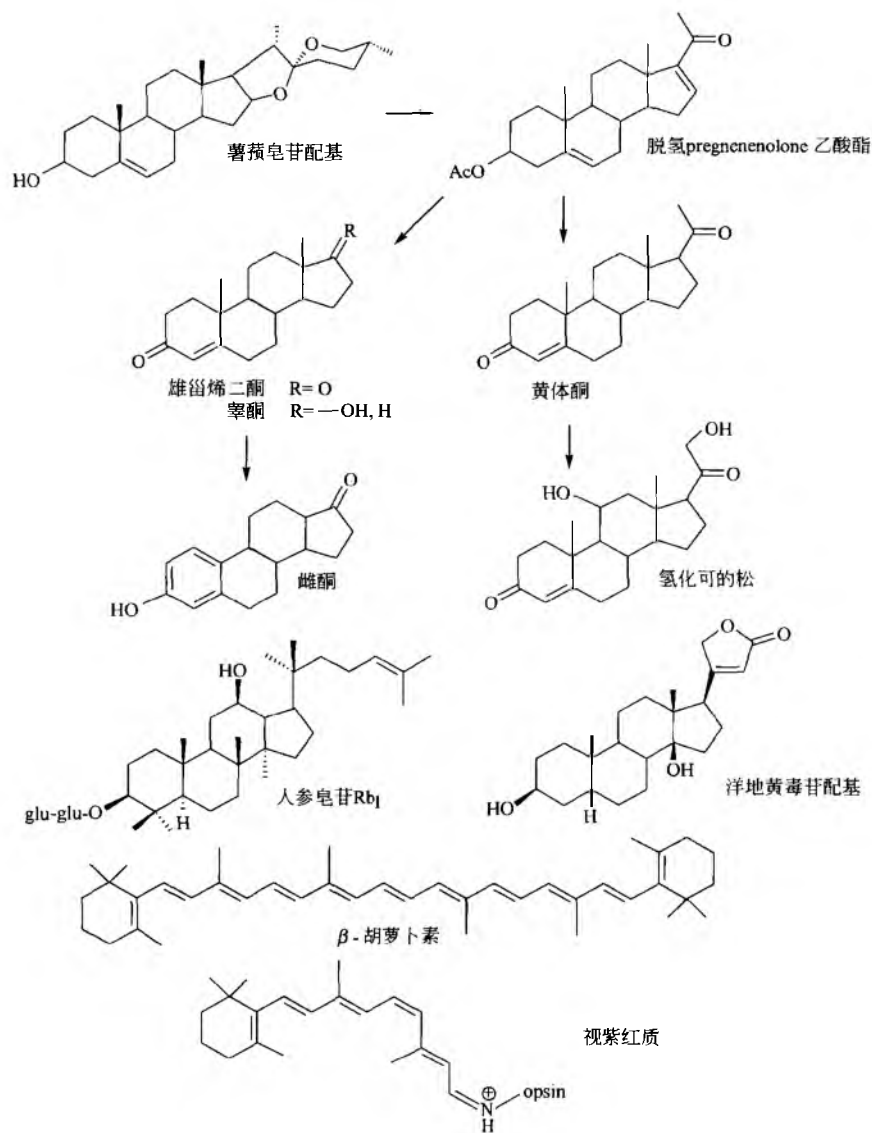


图21 代表性的三萜降解物、甾体和类胡萝卜素



毛花洋地黄类的强心苷，由 3 个或 4 个糖的多糖单元组成，多羟基（洋地黄毒苷元的 C-3 β ，C-12 β ，C-14 β ）甾核的 C-3 位会修饰带有一些 2，6-二脱氧己糖。对 20-酮基-孕烷进行修饰，通过羟基化、乙酸盐的引入、环化得到一个 α ， β -不饱和丁内酯。葫芦素、醉茄内酯、蜕皮激素、香胶甾酮、柠檬苦素、苦木素也是修饰后的三萜衍生物，具有包括高的细胞毒在内的较强的生物效应（图 21）。

类胡萝卜素是四萜化合物，通过 3，7-二甲基-2，6-辛二烯焦磷酸酯的尾尾偶合，再在每个终端环化形成（如胡萝卜中的 β -胡萝卜素）。它们广泛用作食品、糕饼、药物的着色剂。正在研究将 β -胡萝卜素用作抗氧化剂，从而预防癌症。 β -胡萝卜素裂解产生视黄醇（维生素 A₁，图 21）。类视黄醛是一种重要的信号剂，调节细胞分化、胚胎发育、成长和视觉等多个过程（视网膜紫质是 11-顺式-视黄醛的衍生物与视蛋白的衍生物）。

生物碱

生物碱是含氮的次生代谢产物，它们所含氮和一部分碳结构主要来自于氨基酸。然而，大约 27 000 种已知的生物碱不能被简单地定义。许多生物碱及其衍生物都显示复杂的生物学效应和巨大的商业、药用和社会意义。鸟氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、色氨酸是其主要的氨基酸前体。

1. 来源于鸟氨酸和赖氨酸的生物碱

来源于鸟氨酸的生物碱可分为三大类：烟碱、吡咯烷类和莨菪烷，它们都有重要的生物效应。来源于赖氨酸的是：哌啶类生物碱（如山梗菜碱，一种戒烟剂）、喹啉类生物碱（如金雀花碱，一种催产药）和金雀儿碱（致畸剂，图 22）。这里仅讨论来源于鸟氨酸的生物碱。



图 22 来源于鸟氨酸和赖氨酸的代表性生物碱

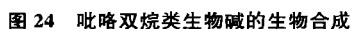
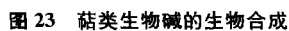
菊目（茄科）和牻牛儿苗（古柯科），两种非常不同的分类群，通过相似却不同的路径形成莨菪烷。用茄科植物中的 [2-¹⁴C]-鸟氨酸，标记桥头碳 C-1，排除非结合的对称的中间体。在茄属植物颠茄中，鸟氨酸的 N-甲基化先脱羧得到 N-甲基吡哆素。与此不同的是，在古柯属植物古柯中，桥头 C-1 和 C-5 都被标记，提示非结合的腐肉碱是甲基化的。氧化去氨基得到醛，经过 Mannich 闭合得到 N-甲基-吡咯啉；再和乙酰乙酸盐缩合得到古豆碱-1'-羧酸。

脱羧后氧化成环得到莨菪酮，然后经立体特异性还原得到 α -羟基基团，酯化得莨菪碱。酯化的酯，托品酸，是一种苯乳酸（来自苯丙氨酸）的分子内部重排。莨菪碱的进一步修饰产生东莨菪碱（图 23）。这步转化的酶是已

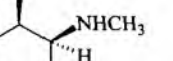
知的。

在可卡因的生物合成中，羧酸得以保留生成甲酯，经立体特异性还原后得到 β -乙醇，苯甲酰化得到可卡因（图 23）。虽然可卡因被广泛认为是一种滥用的药物，但在南美洲咀嚼古柯叶——这项每天的习惯，已经有几千年历史了。

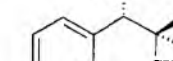
没有药物是基于紫菀科（如千里光属和黑草）和紫草科（*Crotolaria*）的吡咯烷土定类生物碱。然而由于使用不慎，这些生物碱对人类和动物的健康有极大的危险。至于 1，2-去氢衍生物，如千里光宁碱，摄入会有不可逆的肝毒性。吡咯双烷核是由两个鸟氨酸单元形成的，如图 24 所示。




但现在是合成的) 和伪麻黄碱, 分别用于哮喘和减轻鼻充血。阿拉伯茶(阿拉伯茶属) 包含卡西酮, 在阿拉伯半岛东南部作为兴奋剂广泛使用。酪氨酸是神经递质去甲肾上腺素和激素肾上腺素的前体。来源于魔根属蘑菇的迷幻剂仙人球毒碱, 也是该系列的一员(图 25)。



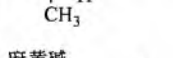
(-) - 麻黄碱



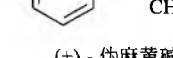
(+) - 伪麻黄碱




卡西酮



去甲肾上腺素 R = H
肾上腺素 R = CH₃



仙人球毒碱



仙人掌次碱

图 25 来源于苯丙氨酸和酪氨酸的简单生物碱

4-羟基-苯乙醛，在去甲乌药碱合酶的作用下，与多巴胺缩合得到 (S)-去甲乌药碱，它是所有苯甲基异喹啉生物碱的祖先 (图 26)。Robinson 于 1917 年首次提出罂粟碱、

阿朴啡、吗啡南、原小檗碱均来源于苄基异喹啉前体的生源论。这些观念最终帮助人们认识到了吗啡的正确结构，并扩展包括了大量的生物碱 (图 27)。



图 26 (S)-去甲乌药碱和 (S)-牛心果碱的生物合成

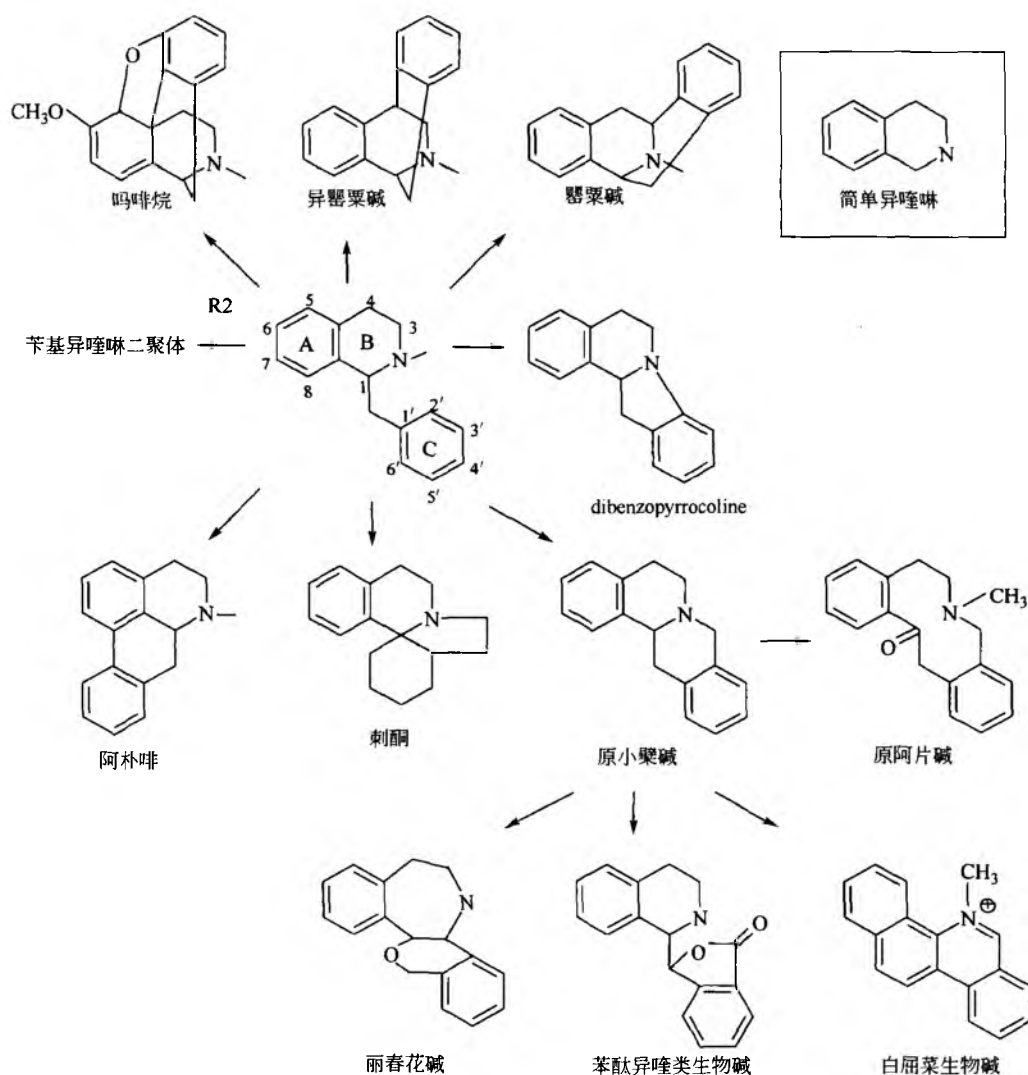


图 27 苄基异喹啉生物碱主要大类的生物合成的内在关系

罂粟碱是少数几种合成的而不是分离的商用生物碱之一。它可单独用于治疗不同的血管的病症，也可联合给药用作解痉药。双苯甲基异喹啉生物碱的分类是基于单元之

间的键数和它们的定向。生物碱在防己科和毛茛科中是普遍存在的。其中筒箭毒碱是神经肌肉阻滞剂的原形；筒箭毒碱曾在亚马孙河上游作为箭毒使用，从而使人们了解到

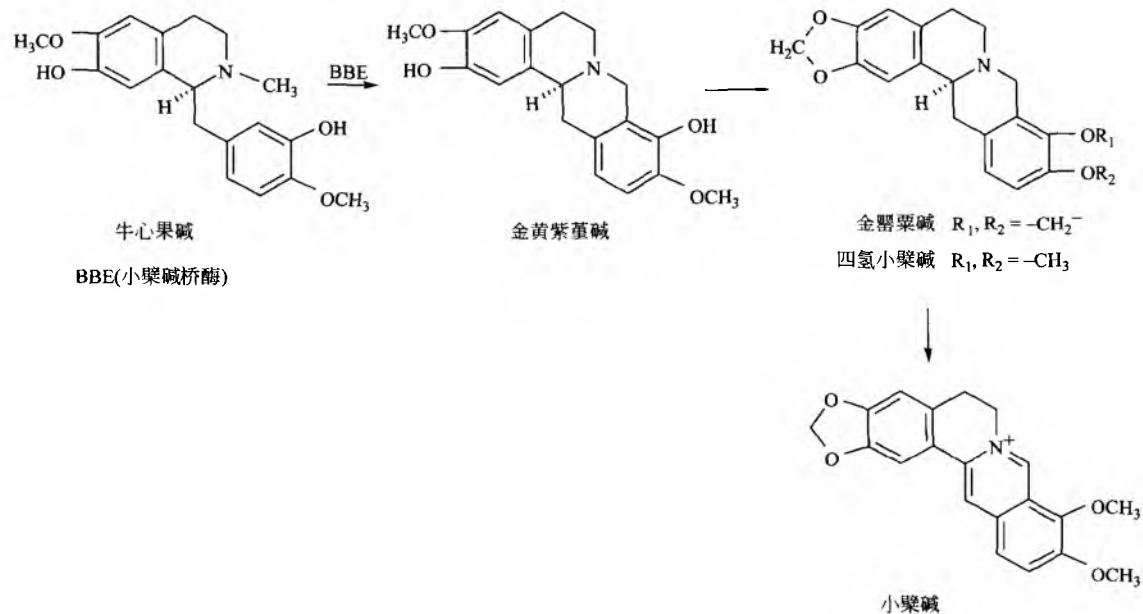


图 28 原小檗碱的生物合成

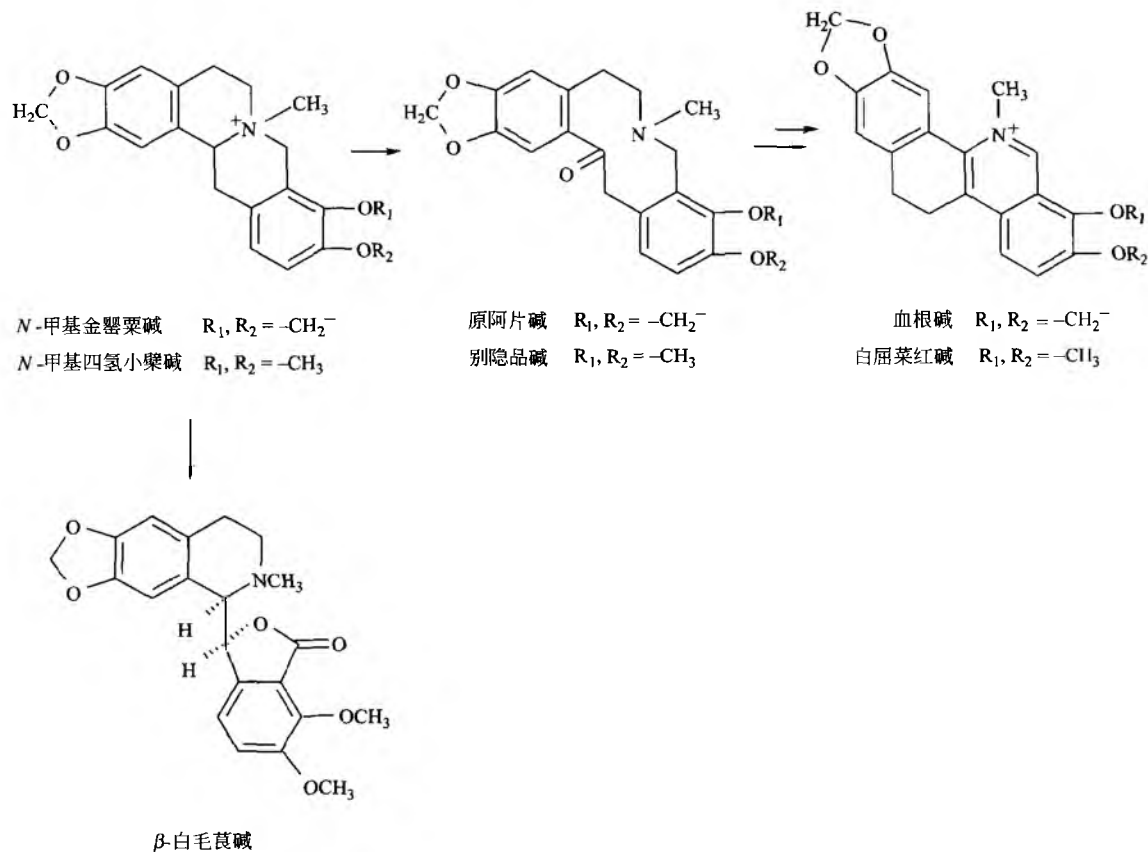


图 29 β-白毛茛碱和血根碱的生物合成

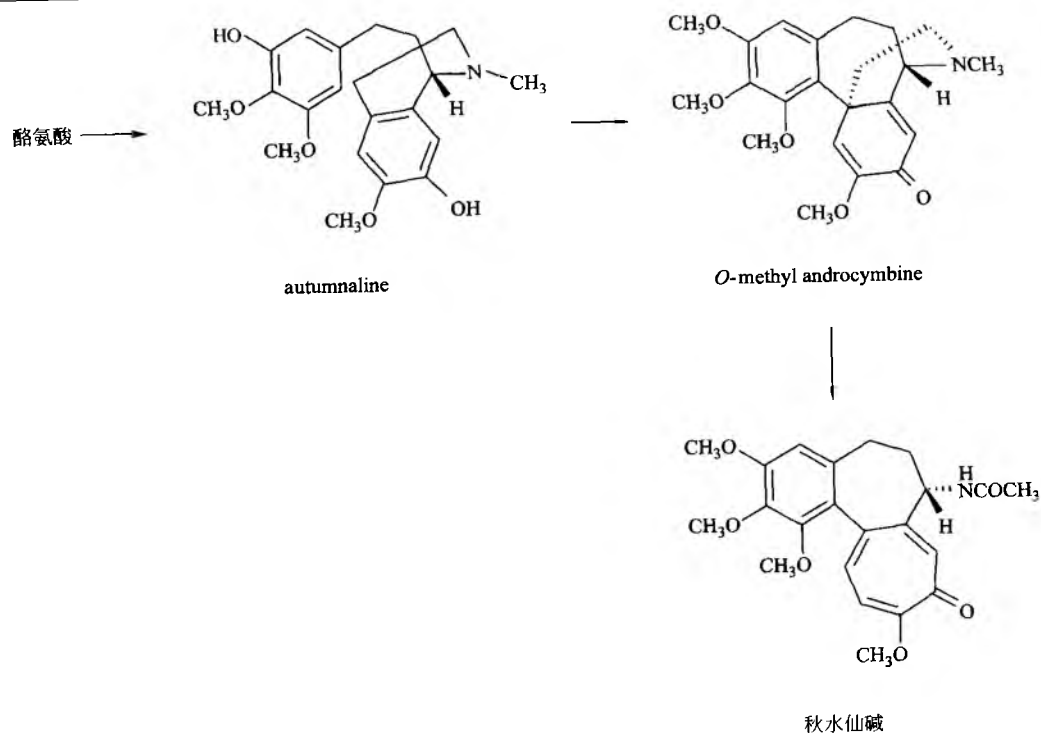


图 31 秋水仙碱的生物合成

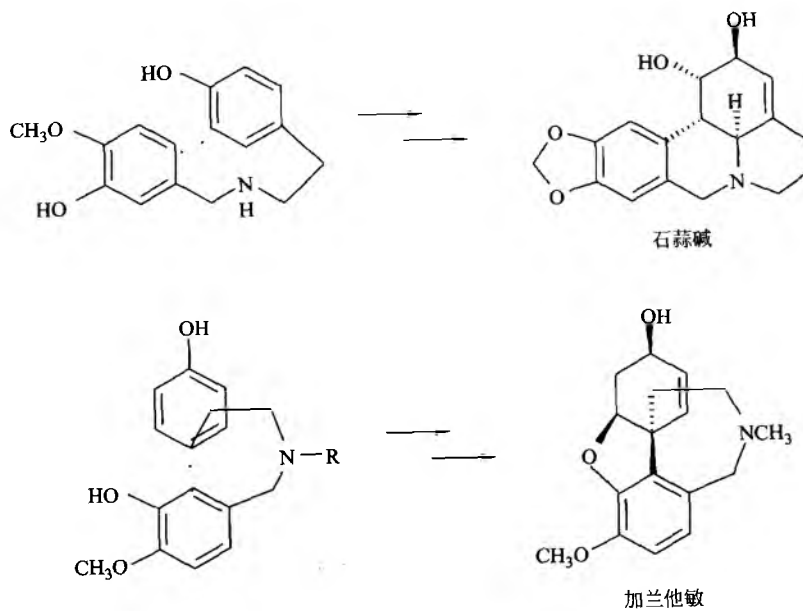


图 32 一些石蒜科生物碱的生物合成

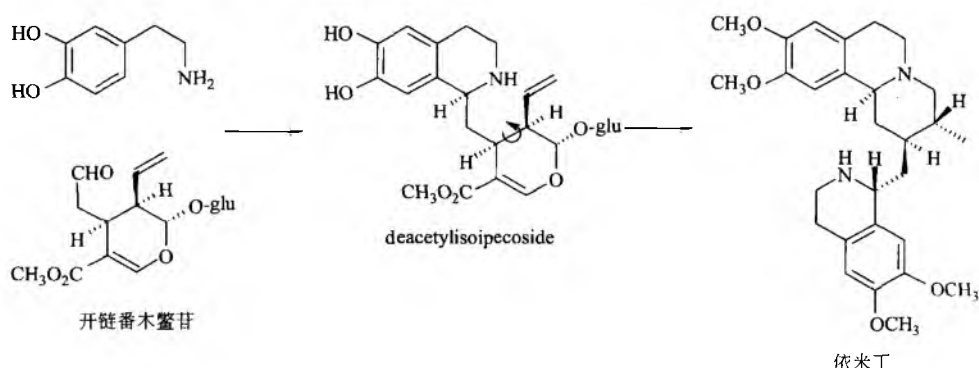


图 33 依米丁的生物合成

3. 来源于色氨酸的生物碱

许多有重要的临床意义的生物碱来源于色氨酸，往往被称为吲哚生物碱。其分子复杂性各异，有简单的哺乳动物激素 5-羟色胺，也有复杂的具有抗癌作用的双二氢吲哚生物碱长春新碱。另外，大量的吲哚生物碱，特别是吡唑

系列，发现存在于胡椒中；色胺的简单衍生物（如 *N,N*-二甲基-5-甲氧基色胺和赛洛西宾）存在于在几种有致幻特性的来源（如烛花、蘑菇、蟾蜍皮肤）中。

研究用于阿尔茨海默病的毒扁豆碱，可能是 *N*_b-甲基色胺通过一个游离基机理形成，机理包括：C-3 甲基化并伴随 C-2 环化，随后 *N*_b-甲基化（图 34）。

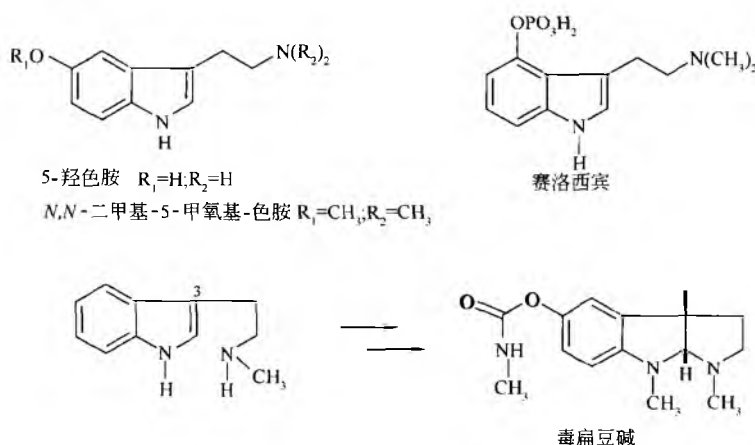


图 34 来源于色氨酸的简单生物碱

早在 1000 年前人们就认识到了麦角的强生物学效应。麦角是菌类（黑麦角），寄生在黑麦和一些其他谷物上，产生三种麦角生物碱——棒麦角素，简单的衍生麦角酸，和衍生的肽类麦角酸生物碱。此类生物碱可用于治疗产后出血（甲基麦角新碱），还可作为血管收缩剂和血管调节剂（麦角胺和 9, 10-二氢麦角胺）治疗偏头痛。还有更多修饰过的合成衍生物，包括麦角乙脞（帕金森病）和 2-溴- α -麦角隐亭（催乳素腺瘤和帕金森病，图 35）。

麦角灵核的生物合成途径是通过 4-二甲基烯丙基色氨酸（4-DMAT）、裸麦角碱-I、田麦角碱和麦角酸依次进行的。分别在裸麦角碱-I 和田麦角碱之前出现了两个顺式、反式异构化，如 $[2-^{14}C]$ -甲羟戊酸和 $[Z-CH_3]$ -4-DMAT 的实验所示（图 36）。肽单元是三个氨基酸结合的衍生物，其中一个常为脯氨酸。一些旋花科植物（莨苳属、药薯属等）也产生麦角生物碱。

最大的一类生物碱是单萜类吲哚生物碱，分布在夹竹

桃科（和强心甙相互排斥）、茜草科和马钱科。不同系统的分子特性来源于原始生物碱异胡豆苷的去葡萄糖基化，这也解释了这类分子让人迷惑的结构多样性。

从几种可以产生单萜吲哚生物的物种中可以分离得到异胡豆苷合成酶，在这种酶的作用下，以色胺和开链番木鳖苷为底物，可以立体特异性的得到异胡豆苷。该种酶可以被克隆，能大量表达（图 37）。

去葡萄糖基化后，合成途径为通过 4, 21-去羟缝籽木早灵的衍生物阿马里新（一种 α -阻滞解痉药，与一种麦角衍生物合用用于耳鸣和颅内创伤）。如果在 C-17 和 C-18 位之间出现环化，则产生育亨宾核，其衍生物包括萝芙木属生物碱利血平和利血胺（有抗高血压活性）。从前用作抗心律失常的阿义马林，也存在于萝芙木属中，并且路径中的几种酶也得以分离。近年来提出 C-16—C-5 的结合先于 N-4-C-21 的结合（图 38）。

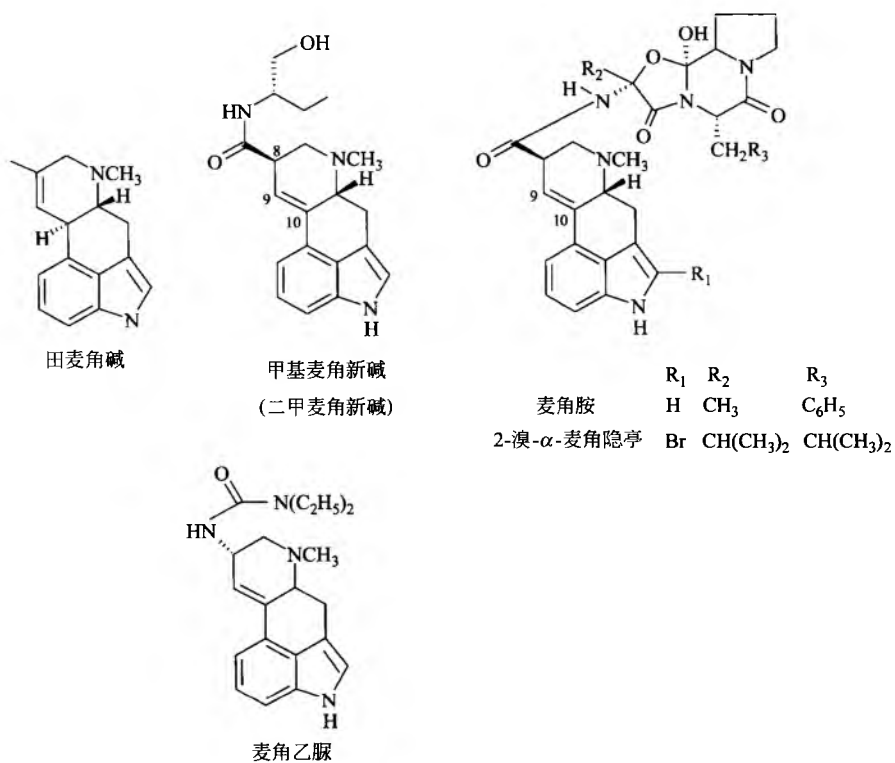


图 35 代表性的麦角生物碱

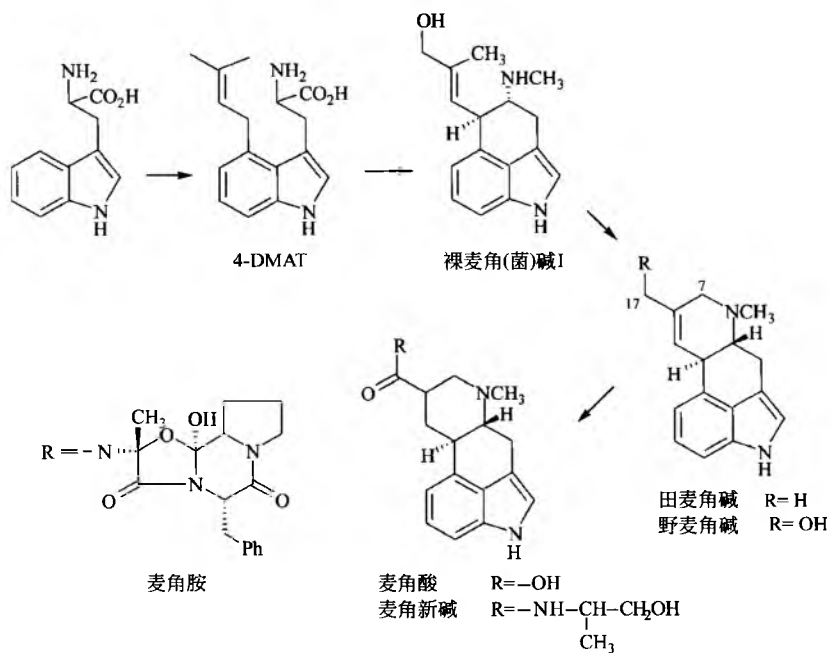


图 36 麦角生物碱的生物合成

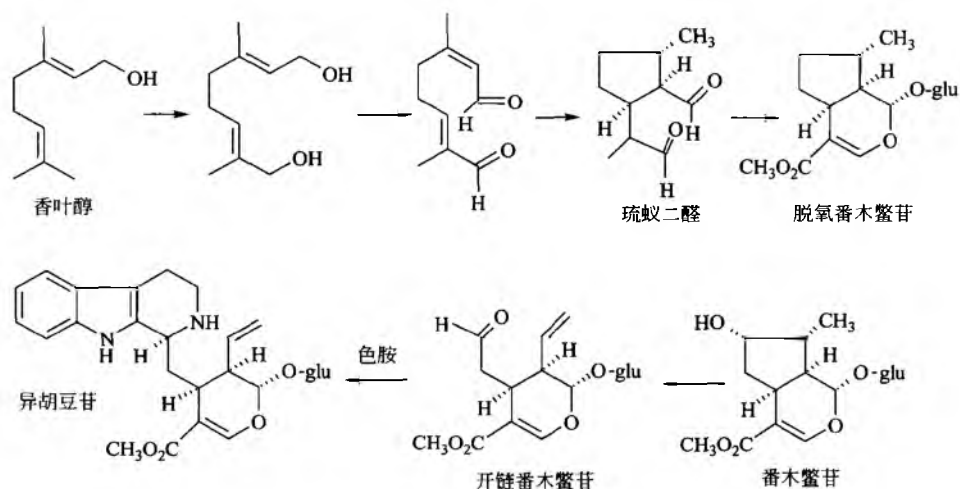


图 37 异胡豆苷的生物合成

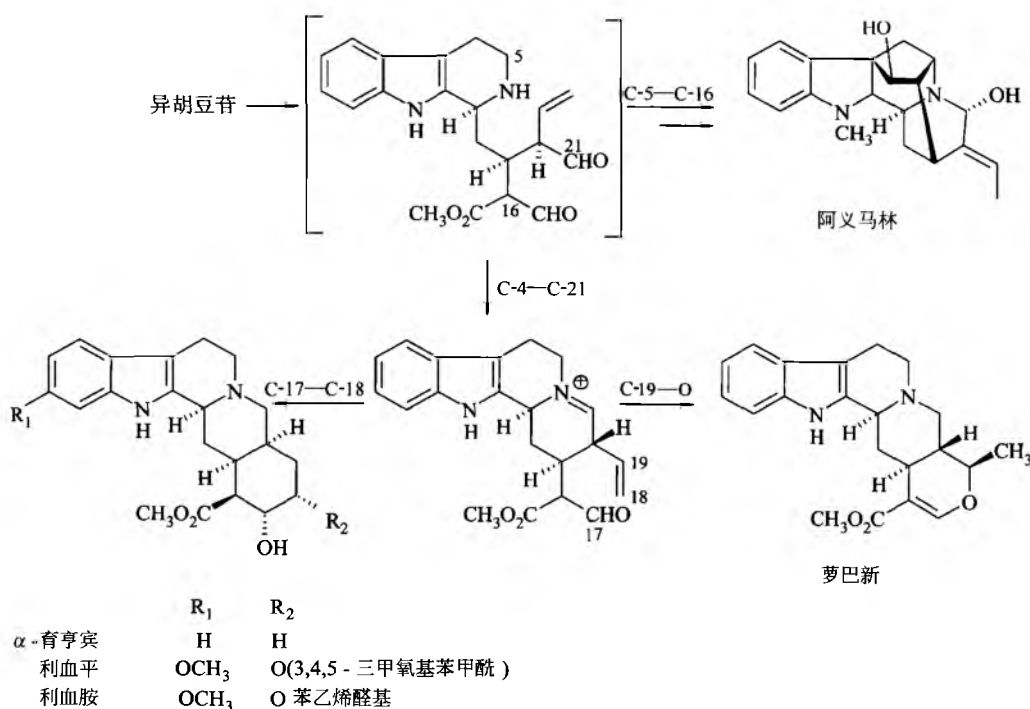


图 38 阿义马林、萝巴新、育亨宾、利血平和利血胺的生物合成

由于早期前体的结合以及生物碱来源研究水平比较低，从缝籽木早灵到形成马钱子属生物碱、secodine、白坚木属生物碱和伊博加 (iboga, 一种致幻剂) 生物碱的步骤仍然是推测性的。移动 C-3 到 C-7 时，加入 C-2 和 C-16，得到番木鳖碱的马钱子碱骨架 (致死剂量 0.2mg/kg)，在一些国家仍然作为杀虫剂使用。

如果 C-15、C-16 之间的键氧化断裂，那么 secodine 骨架 (白坚木和伊博加系统的前体) 通过选择的 Diels-Alder 型环化，得到水甘草碱和长春碱。长春花属的双吲哚生物碱反映了长春刀灵和长春碱的联合，产生脱水长春碱；修饰后可获得具有临床意义的生物碱，长春碱 (VLB) 和长

春新碱 (VCR, 图 39)。生物碱，特别是 VCR，作为重要的抗癌剂，引起了半合成衍生物长春碱酰胺和长春瑞宾的发现 (图 40)。现在已经有了连接单个单体的合成方法。从水甘草碱到长春刀灵酶的控制程序已经得以阐明。

通过拟生态途径，水甘草碱也是长春胺的半合成前体，而长春胺是一种从长春花属中分离出来的 Eburna 生物碱，在欧洲用于脑功能不全。马山茶碱伊博加在热带非洲作为兴奋剂使用已经有很长的历史；它的主要有效成分是伊博加因，在许多国家是受控药 (图 40)。由于它可能对鸦片成瘾有戒毒作用，所以在美国研究很热门。

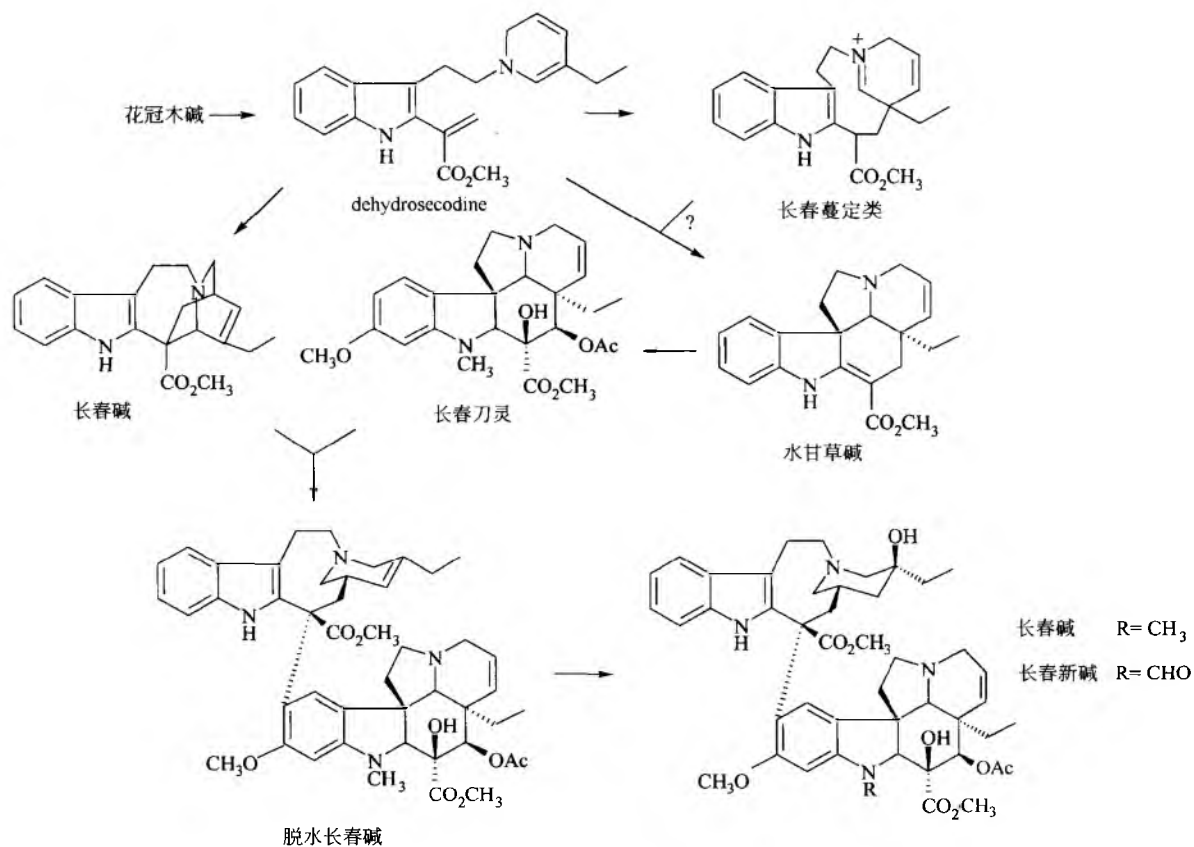


图 39 长春碱的生物合成

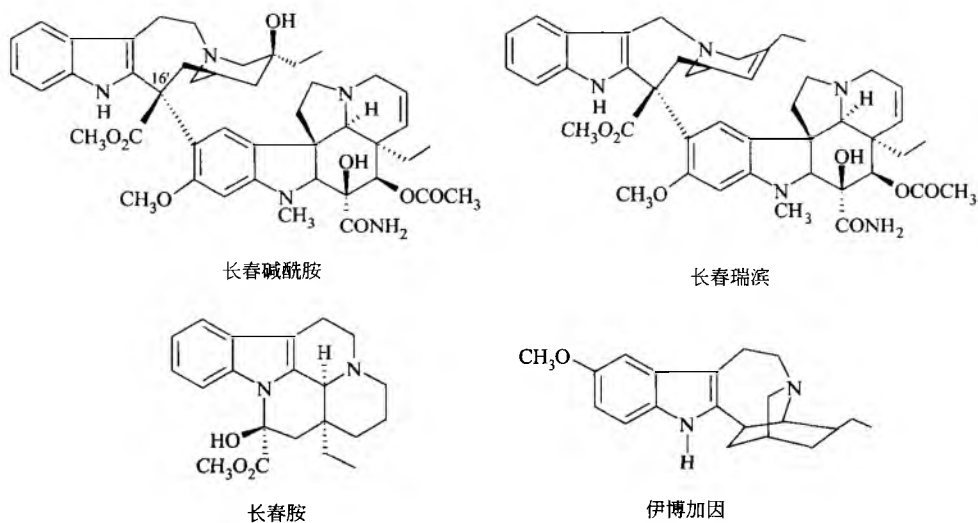


图 40 代表性的高级吲哚生物碱

喜树碱是一种喜树（紫树科）喹啉类生物碱，由异胡豆苷经 strictosamide 衍生得到（图 41）。最初于 1966 年得以分离，生物学方面它能抑制拓扑异构酶 I。1996 年，其

两种衍生物托泊替康和依立替康，被证明可分别用于治疗卵巢癌和结肠癌。其他衍生物还处于临床试验阶段。

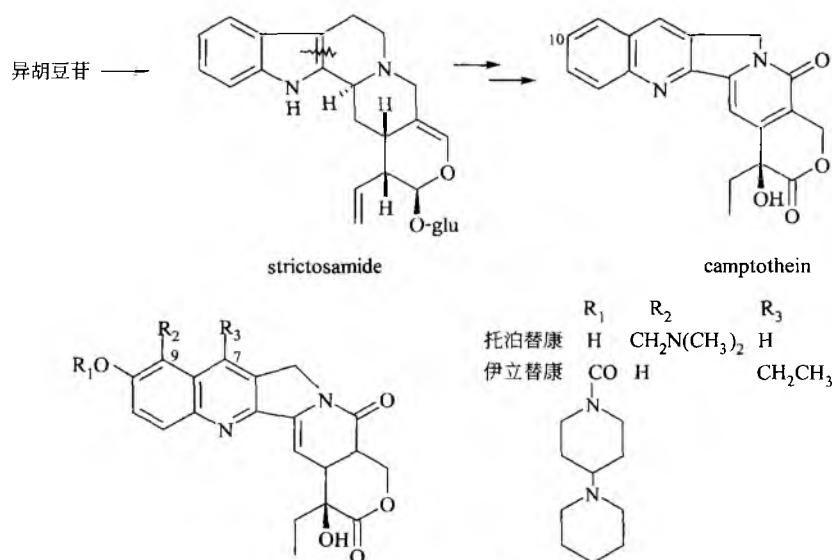


图 41 喜树碱的生物合成

金鸡纳树（茜草科）包含一个喹啉核，是奎宁和奎尼丁的来源，通过对异胡豆苷进行多步修饰而得（图 42）。抗疟药奎宁的有趣的历史和过去 350 多年它在世界政治舞台

上的政治作用是传奇性的。它是仅有的一种患者不会抵触的抗疟药。然而它的广泛用途是用作滋补饮料。奎尼丁是奎宁的异构体，用于治疗心律不齐。

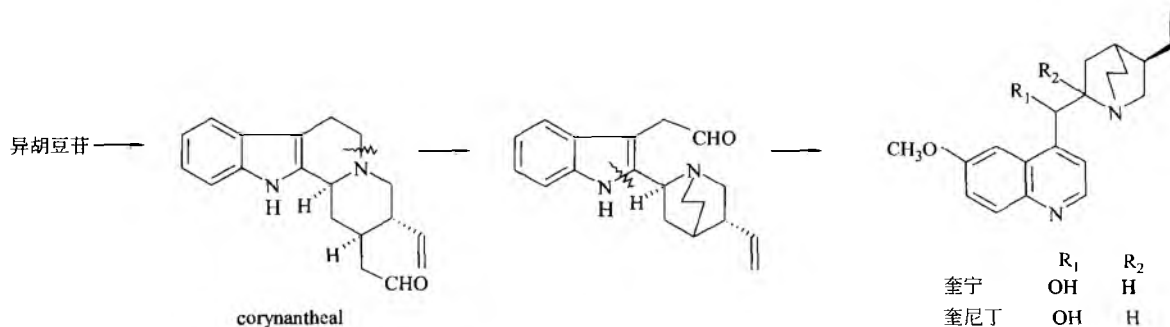


图 42 奎宁和奎尼丁的生物合成

4. 萜烯骨架生物碱

尽管已知许多单萜生物碱和倍半萜生物碱，然而它们的生物学效应却非常有限。相反，毛茛科的二萜类生物碱（如来自于乌头属和翠雀属的生物碱）却有很强的生物学效应。重要的生物碱是和乌头碱（图 43）相关的一类，通过兴奋和麻痹外周神经末梢起作用。这些植物是已知的最毒的植物，仅 10g 乌头即可致死。传统医学的几个主要系统中均采用去毒的根制品入药。贝壳杉烯的骨架进行重排可得到枪丝核。

甾体生物碱有一个 21、24 或 27 碳的母核（图 44）。C21 生物碱是在孕烷的 C-3、C-20 或两个位置上插入氮衍生物得到的。它们是夹竹桃科（丝胶树属和止泻木雷宁属）、黄杨科（黄杨属）特有的。黄杨科也有基于环木菠萝烷骨架的 24C 生物碱。最有趣的生物碱是茄科和百合科中的生物碱，这些是 27C 生物碱。例如，包括澳洲茄次碱和茄啉和许多衍生物是糖基化的。来源于百合科的生物碱，如白

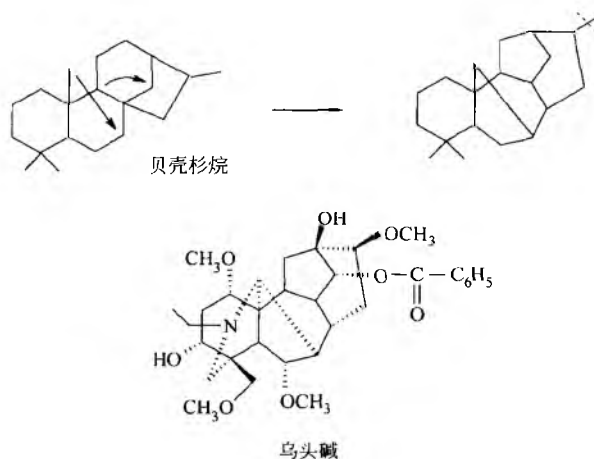


图 43 乌头碱的生物合成

藜芦（藜芦属）的藜芦胺，以前用于心功能不全。其他的

生物碱，如环杷明，是有效的致畸剂。它们都是通过 C-22 位插入氮，随后重排产生 C-去甲-D 同型甾体母核而进行

生物合成（图 44）。它们没有治疗用途，但是茄属（马铃薯）的生物碱芥类是非常毒的，且加热不会破坏。

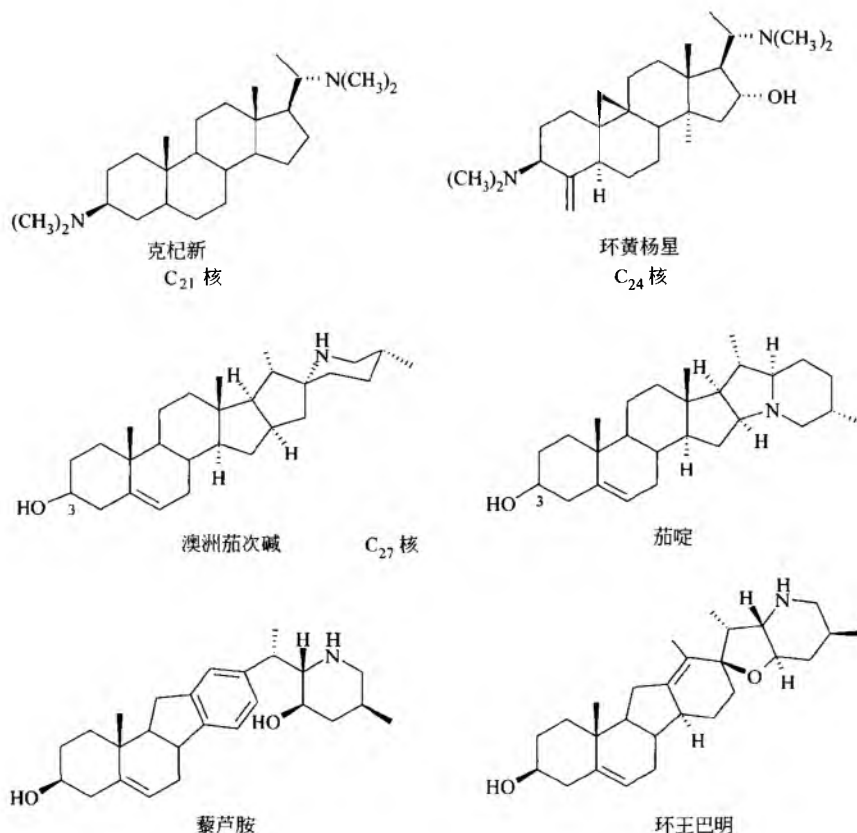


图 44 代表性的甾体生物碱

5. 来自核苷酸前体的生物碱

咖啡因是日常消耗最大的生物碱之一。除了是咖啡（阿拉伯咖啡）和茶的重要的成分之外，咖啡因也存在可乐树（可乐种）、巴西可可（瓜拿纳）和冬青（巴拉圭冬青）中。所有这些在世界的不同地方均用于生产饮料以减轻

疲劳。

虽然目前一些步骤尚需完全阐明，但咖啡因很可能通过如下途径而得到：以肌苷单磷酸酯为初始，经黄嘌呤核苷、7-甲基黄嘌呤核苷、7-甲基黄嘌呤、3, 7-二甲基黄嘌呤（可可碱）（图 45）。最后所需的甲基转移酶是咖啡和茶所特有的，而黄嘌呤核苷的甲基化仅在茶中有研究。

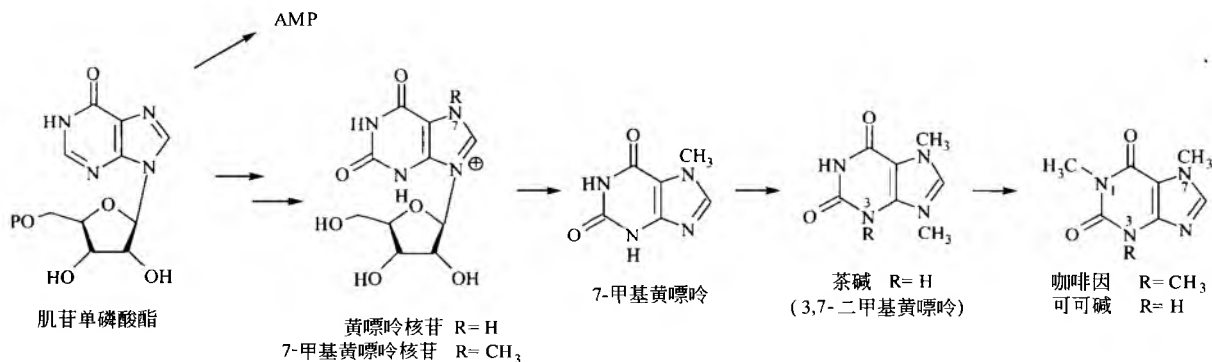


图 45 嘌呤生物碱的生物合成

咖啡因可以显著刺激中枢神经系统的活性，能够增强肌收缩力并有轻微的利尿活性。胆茶碱（1,3-二甲基黄嘌呤）可以作为平滑肌松弛剂，用于治疗慢性哮喘。

6. 来自其他前体的生物碱

乙酸盐可以以多聚乙酰链的形式和一种未知的氮源（和在萜烯生物碱中相似）反应，它也是一些生物碱的前

体。乙酸盐派生的生物碱，如毒芹碱（欧毒芹的毒性成分）、来自几种松属种类的松里汀、萘基异喹啉生物碱（如钩枝藤碱），显示了抗疟和抗 HIV 活性。后者是由两个戊烯胺的氧化偶合得来的。从石松（锯齿状石杉碱）中分离得到的石杉碱甲，近来在临床试验用于治疗阿尔茨海默病，是从聚乙炔前体得来的（图 46）。

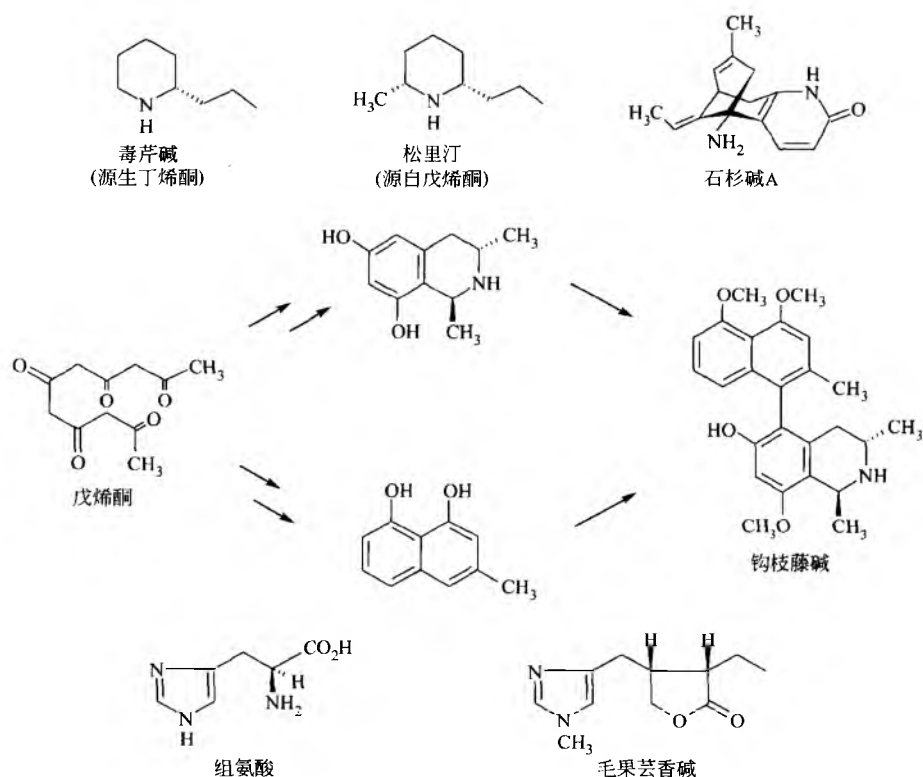


图 46 源生乙酸和组氨酸的生物碱

组氨酸是一类数量有限的生物碱的前体。最有名的就是毛果芸香属叶子的毛果芸香碱。这种植物以前作为真血清 (truth serum) 应用 (促发汗活性)，这类生物碱用于对抗阿托品的瞳孔放大作用。

来自产黄青霉菌的青霉素，是最早的应用最广的抗生素。它是通过 α -氨基己二酸、半胱氨酸、加压素的三肽 (ACV) 分步累加形成。持续的氧化步骤形成 β -内酰胺并封闭了四氢噻唑环形成异青霉素 N。在酰基转移酶的作用下产生青霉素 G (图 47)。异青霉素 N (或青霉素 G) 水解产生 6-氨基青霉烷酸，是生产治疗用途的大量半合成青霉素

的关键前体。

头孢菌素是修饰后的青霉素衍生物，由头孢菌素 C 产生，可异构化得青霉素 N，随着环扩展增加一个甲基和羟基化，可产生去乙酰头孢菌素 C (图 48)。另外，酰化侧链的移除得到 7-氨基头孢烷酸，是产生现有的头孢菌素生物多样性的关键步。单酰胺菌素，如来自青紫色杆菌属的 SQ26180，包含一个 3-甲氧基团和一个 N-磺酸盐部分。碳骨架来自丝氨酸。较复杂的衍生物，如诺卡菌素 A，是通过一个类似于青霉素的三肽途径形成的 (图 49)。

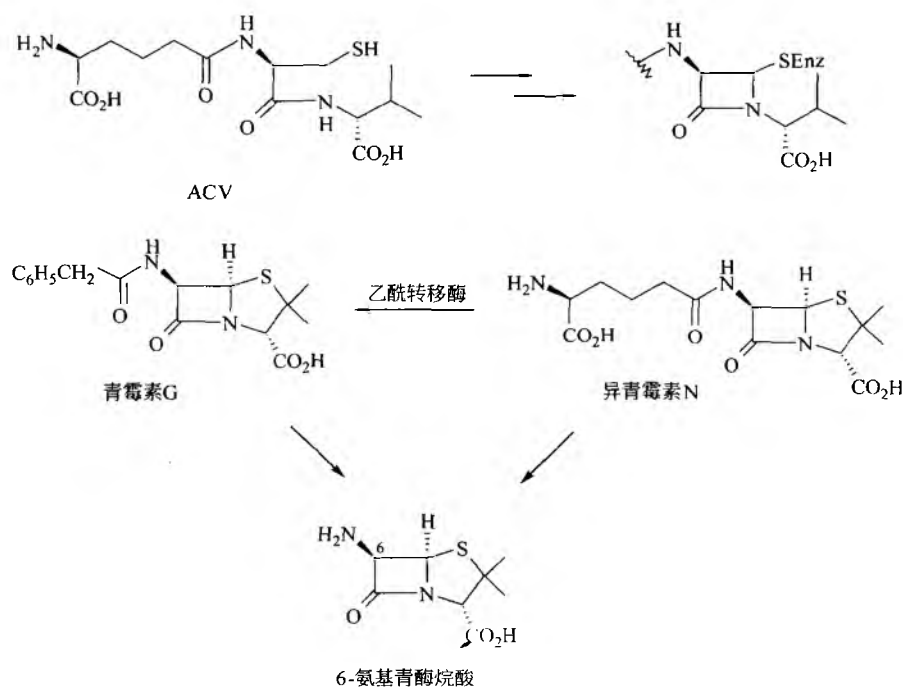


图 47 青霉素 G 的生物合成

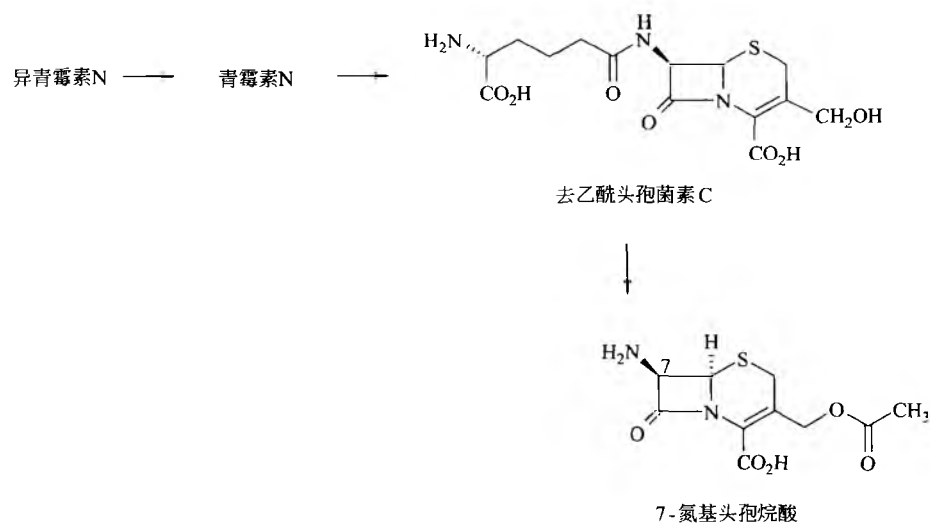


图 48 去乙酰头孢菌素 C 的生物合成



图 49 诺卡菌素 A 的生源

参 考 书 目

- Baldwin, J. E. The Biosynthesis of Penicillins and Cephalosporins. *J. Heterocyclic Chem.* 1990, 27, 71—78.
- Beale, M. H. The Biosynthesis of C₅—C₂₀ Terpenoid Compounds. *Nat. Prod. Rep.* 1991, 8, 441—454; 1990; 7, 387—407; 1990; 7, 25—39.
- Brown, G. D. The Biosynthesis of Steroids and Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 1998, 15, 653—696.
- Brown, S. A. Methodology. Biosynthesis; Geissman, T. A., Ed.; The Chemical Society: London, 1972; 1, 1—40.
- Bruneton, J. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants; Lavoisier: Paris, 1995; 915.
- Chang, S.-I.; Hammes, G. G. Structure and Mechanism of Action of a Multifunction Enzyme; Fatty Acid Synthase. *Acc. Chem. Res.* 1990, 23, 363—369.
- Cordell, G. A. Introduction to Alkaloids, A Biogenetic Approach; Wiley Interscience: New York, 1981; 1055.
- Cordell, G. A. The Monoterpene Alkaloids. The Alkaloids; Chemistry and Biology; Cordell, G. A., Ed.; Academic Press: San Diego CA, 1999; 52, 261—376.
- Daly, J. W.; Jerina, D. M.; Witkop, B. Arene Oxides and the NIH Shift: The Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity of Aromatic Compounds. *Experientia* 1972, 28, 1129—1149.
- Dewick, P. M. The Biosynthesis of Shikimate Metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 1998, 15, 17—58, 1995, 12, 579—607; 1995, 12, 101—133; 1994, 11, 173—203; 1993, 10, 233—263; 1992, 9, 153—181.
- Dewick, P. M. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach; John Wiley & Sons: Chichester, 1997, 466.
- Dewick, P. M. The Biosynthesis of C₅—C₂₅ Terpenoid Compounds. *Nat. Prod. Rep.* 1999, 16, 97—130, 1997, 14, 111—144; 1995, 12, 507—534.
- Estévez-Braun, A.; González, A. G. Coumarins. *Nat. Prod. Rep.* 1997, 14, 465—475.
- Gröger, D.; Floss, H. G. Biochemistry of Ergot Alkaloids: Achievements and Challenges. The Alkaloids; Chemistry and Biology; Cordell, G. A., Ed.; Academic Press: San Diego CA, 1998; 50, 171—218.
- Herbert, R. B. The Biosynthesis of Secondary Metabolites; Chapman and Hall, London, 1981; 178.
- Herbert, R. B. The Biosynthesis of Plant Alkaloids and Nitrogenous Microbial Metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 1999, 16, 199—208, 1997, 14, 359—372; 1996, 13, 45—58; 1995, 12, 445—464; 1995, 12, 55—68; 1993, 10, 575—592; 1992, 9, 507—529; 1991, 8, 185—209.
- Hutchinson, C. R. The Use of Isotopic Hydrogen and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Techniques for the Analysis of Biosynthetic Pathways. *J. Nat. Prod.* 1982, 45, 27—37.
- Harrison, D. M. The Biosynthesis of Triterpenoids, Steroids, and Carotenoids. *Nat. Prod. Rep.* 1990, 7, 459—484.
- Iwasa, K. The Biotransformation of Protoberberine Alkaloids by Plant Tissue Cultures. The Alkaloids; Chemistry and Pharmacology; Cordell, G. A., Ed.; Academic Press: San Diego CA, 1993; 46, 273—346.
- Jones, D. H. Phenylalanine Ammonia-lyase; Regulation of Its Induction, and Its Role in Plant Development. *Phytochemistry* 1984, 23, 1349—1359.
- Knaggs, A. R. The Biosynthesis of Shikimate Metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 1999, 16, 525—560.
- Kutchan, T. M. Strictosidine: From Alkaloid to Enzyme to Gene. *Phytochemistry* 1993, 32, 493—506.
- Kutchan, T. M. Alkaloid Biosynthesis—The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *Plant Cell* 1995, 7, 1059—1070.
- Mann, J. Secondary Metabolism, 2nd Ed.; Clarendon Press: Oxford, 1987; 374.
- Mann, J.; Davidson, R. S.; Hobbs, J. B.; Banthorpe, D. V.; Harborne, J. B. Natural Products; Longman Scientific and Technical; Harlow, 1994; 455.
- Murray, R. D. H. Coumarins. *Nat. Prod. Rep.* 1995, 12, 477—505.
- Nagabhushan, T.; Miller, G. H.; Varma, K. J. Antibiotics (Chloramphenicol and Analogues). *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th Ed.; John Wiley: New York, 1992; 961—978.
- Nasreen, A.; Gundlach, H.; Zenk, M. H. Incorporation of Phenethylisoquinolines into Colchicine in Isolated Seeds of *Colchicum autumnale*. *Phytochemistry* 1997, 46, 107—115.
- O'Hagan, D. Biosynthesis of Fatty Acid and Polyketide Metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 1995, 12, 1—32, 1993, 10, 593—624; 1992, 9, 447—479.
- Rawlings, B. J. Biosynthesis of Polyketides (Other than Actinomycete Macrolides). *Nat. Prod. Rep.* 1999, 16, 425—484, 1998, 15, 275—308; 1997, 14, 523—556; 1997, 14, 335—358.
- Rohmer, M. The Discovery of a Mevalonate-independent Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria, Algae and Higher Plants. *Nat. Prod. Rep.* 1999, 16, 565—574.
- Robins, R. J.; Walton, N. J. The Biosynthesis of Tropane Alkaloids. The Alkaloids; Chemistry and Pharmacology; Cordell, G. A., Ed.; Academic Press: San Diego CA, 1993; 44, 1116—1187.
- Robins, D. J. Biosynthesis of Pyrrolizidine and Quinolizidine



Y

- Alkaloids. The Alkaloids; Chemistry and Pharmacology; Cordell, G. A., Ed.; Academic Press; San Diego CA, 1995; 46, 1—61.
- Sandmann, G. Carotenoid Biosynthesis in Microorganisms and Plants. *Eur. J. Biochem.* 1994, 223, 7—24.
- Stadler, R.; Zenk, M. H. A Revision of the Generally Accepted Pathway for the Biosynthesis of the Benzyltetrahydroisoquinoline Alkaloid Reticuline. *Liebigs Ann. Chem.* 1990, 555—562.
- Stöckigt, J. Biosynthesis in *Rauwolfia Serpentina*. Modern Aspects of An Old Medicinal Plant. The Alkaloids; Chemistry and Pharmacology; Cordell, G. A., Ed.; Academic Press; San Diego CA, 1995; 47, 115—172.
- Suzuki, T.; Ashihara, H.; Waller, G. R. Purine and Purine Alkaloid Metabolism in *Camelia* and *Coffea* Plants. *Phytochemistry* 1992, 31, 2575—2584.
- Torssell, K. B. G. *Natural Product Chemistry*, 2nd Ed.; Apotekarsocieteten: Stockholm, 1997; 480.
- Townsend, C. A. Oxidative Amino Acid Processing in β -Lactam Antibiotic Biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 1993, 21, 208—213.
- Veders, J. C. The Use of Stable Isotopes in Biosynthetic Studies. *Nat. Prod. Rep.* 1987, 4, 277—337.
- Verpoorte, R.; van der Heijden, R.; Moreno, P. R. H. Biosynthesis of Terpenoid Indole Alkaloids in *Catharanthus roseus* Cells. The Alkaloids; Chemistry and Pharmacology; Cordell, G. A., Ed.; Academic Press; San Diego CA, 1997; 49, 221—299.
- Zenk, M. H.; Gerardy, R.; Stadler, R. Phenol Oxidative Coupling of Benzylisoquinoline Alkaloids is Catalyzed by Regio- and Stereo-selective Cytochrome P450 Linked Plant Enzymes; Salutaridine and Berbamunine. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1989, 1725—1727.

(沈航孝 张小红 译)

索引

A

阿拉伯胶 288, 291, 361, 755
阿司帕坦 787, 1487, 2160
阿司匹林 1009
安瓿 640, 2608
安培测定法 1871
安全性评价 2254
安装确认 620, 1233, 2425
氨基葡萄糖 1386
氨基酸结合反应 1835
氨基乙酸 365
凹坑腐蚀 2558
螯合剂 362, 2608
奥氏成熟 1132, 1135
奥氏体不锈钢 2562

B

巴氏灭活法 2617
巴西棕榈蜡 862
靶向给药 79, 1996
靶向释放制剂 2018
白蛋白 365
版权 2627
半刚性容器 2608
半固体制剂 1, 292, 1124, 2122
半胱氨酸 363, 2608
半乳甘露聚糖 756
半衰期 901
包合技术 550
包合物 551, 2021
包糖衣 2264
包衣 862, 918, 1488, 2516
包衣锅 763
包衣锅包衣法 1421
包衣片剂 642
包衣丸剂 642
包衣微丸 289
包装材料 2464
胞饮 1258, 1865
饱和弹性体 2466

保湿剂 292
背向散射电子 2500
被动靶向 2348
被动扩散 1257
被动转运 1864
本体降解 2674
苯丙氨酸 1806
苯酚 2608
苯甲醇 213, 363, 2160, 2608
苯甲酸 292, 1130
苯醌扭体分析 147
苯氧乙醇 292, 1130
崩解 1261, 2337
崩解剂 38, 287, 320, 1012, 1022, 1039, 2507
崩塌效应 442
鼻黏膜 1957
鼻腔给药 172, 666, 1861, 1957, 1961
鼻用溶液剂 654
比湿度 414
吡哆酸, 1516, 1519
蓖麻油 2608
壁喷流池 1873
编码混合合成 1936
变更控制 914
变态反应 1727
标准操作规程 282
表观分布容积 900
表观分配系数 2014
表面等离子共振 932
表面活性剂 135, 292, 766, 836, 838, 919, 1129, 1681, 1868, 2146, 2608
表面活性剂凝胶 2119
表面溶蚀 2675, 2677
表面张力 554, 1681
表面自由能 1681
冰点降低法 554, 2382
丙氨酸 365
丙二醇 213, 230, 291, 1062, 1131,

1459, 2608
丙二酰硫脲法 2653
丙交酯-乙交酯共聚物 758, 994
丙三醇 290
丙烯酸 2004
病毒灭活 2613
病毒验证实验 2615
病例报告表 890, 891
玻璃 1646, 2094
玻璃化转变 767, 883, 2673
玻璃混悬液 428
玻璃溶液 428
玻璃纤维材料 518
泊洛沙姆 376, 985, 1130
薄层池 1873
薄层色谱 554, 1150
薄膜包衣 762, 2265, 2450
薄膜挤出 611
薄膜渗透性 766
不饱和的弹性体 2466
不分流进样 1174
不均一成核 683
不可见颗粒 2091
不可逆的药理应答 1780
不锈钢 2562, 2568

C

参比电极 1870
残留溶剂 355
操作认证 853
草药 1381, 2244
草药疗法 2244
层流 25
层流净化台 23
层流设备 23
层流生物安全工作柜 24
搽剂 291, 647
差热分析仪 880
差示扫描量热法 865, 880, 1071, 1715, 2117
差示扫描量热仪 880

拆分 2291
掺入 6
产品处方设计专家系统 2359
产品研发 1673
铲角 436, 438
长期稳定性 1067
肠代谢 899
肠道给药 1862
肠道外给药 1860
肠肝循环 1261
肠腔代谢 2015
肠清除 899
肠溶包衣 663, 2019
肠溶材料 764
肠溶衣 2004
肠溶制剂 645, 1124
场发射扫描透射电子显微镜 2501
超奥氏体的不锈钢 2563
超级崩解剂 38
超临界流体 392, 426, 1246
超滤 517, 1752
超声波均质机 739
超声波喷雾器 2279
超声波雾化器 51
超声促渗 190, 704
超声激活型给药系统 1993
超声振动电位 2684
超速离心法 671
潮解 1711
沉淀滴定 99
沉淀剂 652
沉降技术 744
承包生产 58
迟发型过敏反应 1972
充气堆密度 437
冲洗剂 654
虫胶 290
初级代谢产物 1794
储存期 1065
处方前研究 1018
处方设计 2359
处方药 66, 264, 544
处方优化 2664
触变流 588
触变性 2443
传热机制 410
创伤敷料 1218, 1346
吹瓶-灌装-封口 1444, 1476
吹塑成形 611

纯化水 2089
磁激活型给药系统 1993
雌激素 2651
次生代谢产物 1794
刺激试验 151, 1738
促进扩散 1258
促销 66
促氧化剂 2648
醋剂 656
醋酸纤维素 518

D

大容量注射剂 2606
代谢 802
代谢物 73
代谢抑制剂 2021
单变性 1075, 1763
单氟磷酸钠 1592
单光子发射计算机断层成像术 254
单剂量给药装置 1960
单颗粒光学测定器 143
单克隆抗体 79, 1238, 1240, 1242, 2343
单螺杆挤出机 610
单元操作 410, 2176, 2198
单轴剪切测试仪 442
胆固醇 861
胆酸 861
弹性模量 2441
弹性体 2464, 2565
弹性体评价 2470
蛋白结合 901
蛋白稳定剂 2093
蛋白质 171, 968, 1356
蛋白质多肽 200
蛋白质学 494
蛋白质组学 1238
氮磷检测器 1173
氮酮 1459, 1868, 1970
道尔顿定律 2375
等价制剂 1821
等张性 2092
低黏附衬垫 1221
低温变性 829
低温火焰光度法 593
低压供电 2553
滴鼻剂 219, 291, 1958
滴定 99
滴耳剂 291, 640
滴剂 644
缔合胶体 670
点样 1151
电池电位 2560
电磁辐射 506
电导滴定 106
电导检测器 1167
电感耦合等离子体 492
电化学 1704
电化学腐蚀 2558
电化学检测 1870
电化学检测器 1167
电化学免疫测定 1877
电化学免疫分析法 956
电解电导检测器 1175
电力负载 2552
电流滴定 108
电脉冲 188
电抛光 2566, 2569
电迁移 869
电渗 869
电渗析 188
电位 117
电位测定技术 1870
电位滴定 105, 554
电位分析 117
电位免疫测定法 1877
电泳法 554
电泳光散射 2684
电致孔 190, 869
电子捕获 251
电子捕获检测器 1173
电子记录 618, 1454
电子脉冲计数法 671
电子签名 618, 1454
电子数据 618
电子顺磁共振技术 274
电子文档 1449
电子显微镜 2500
电子效应 555
电子制药信息报道 2132
淀粉 111, 288, 289, 435, 983, 2338, 2420, 2672
淀粉浆 288
淀粉衍生物 114
丁基胶 2465
丁基羟基茴香醚 2608
羟胺制剂 225
酞剂 291, 655, 2250

- 顶空分析 1178
顶空氧分析 1702
定量阀 136
定量结构-毒性关系 1939
定量气雾剂 293
定量溶液吸入器 2284
定量吸入剂 133, 335, 388, 1686, 2235, 2276
定量吸入器 2280
定量限 1169
定位给药系统 2039
锭剂 129, 289, 648, 656, 1471
动脉内给药 1860
动态纯竞争 1603
动态淬灭 477
动态光散射法 671
动态黏度 2441
动态热机械法 1074
动物模型 146, 2080
冻干 320, 827, 2522
冻干保护剂 836, 840
冻干成形剂 365
冻胶 859, 976, 1144
毒理基因组学 1938
毒性反应 1727
断层成像仪 254
堆密度 437, 2267
对苯甲酸酯和氯甲酚 1130
对二氧环己酮和聚丙烯二酸丙二酯共聚物 758
对二氧环己酮和聚对苯二羧酸乙二醇共聚物 758
对二氧环己酮和吗啉-2,5-二酮共聚物 758
对羟基苯甲酸酯 292, 363
对映体过量 1289
对映异构体 1082, 2291
钝化 2566, 2570
多层片 289
多级液体撞击器 53
多晶型 698, 838, 883, 1019, 1075, 1262, 1763, 1865
多聚乙酰化合物 1797
多克隆抗体 2343
多孔包衣锅 763
多态现象 1763
多肽 171, 968, 1356
多肽蛋白质 1374, 2672
多糖 2672
多药治疗 812
- ### E
- 儿茶酚 2651
儿科用药 207, 293
耳部给药 219
耳用制剂 224, 1062
二次电子 2500
二次电子显微镜 2501
二次干燥 833
二丁基基甲苯 362, 1131
二甲基亚砷 1062, 1459
二甲基乙酰胺 2608
二甲基乙酰胺 1062
二甲醚 134
二硫丙醇 275
二氧化硅 435
二氧化钛 290, 765
- ### F
- 发光淬灭 477
发射光谱法 492
法拉第技术 1871
翻滚 233
翻转混合器 232
翻转熔融制粒 781
凡士林 1, 292
反触变性 2443
反回扣 71
反基因疫苗 2310
反馈调节型给药系统 1995
反渗透 517
反相色谱 1164
反絮凝剂 589
反义 1238, 1240
反义探针 1435
芳香剂 292
防腐 1470
防腐剂 10, 291, 292, 363, 732, 788, 836, 919, 1130, 1659, 2092, 2608
防腐剂效力测试 16, 18
防黏剂 320
仿制药 245, 2639
放射化学纯度 255
放射免疫测定 256
放射免疫分析 1251
放射性标记 2235
放射性标记的免疫测定 950
放射性核素纯度 255
放射性化学分析 249
放射性衰变 250
放射性同位素 249, 1795
放射性药物 255, 1466
飞行时间粒径分析仪 747
非处方药 66, 259, 385, 544
非环糊精 272
非计划性偏差 915
非均相电流免疫测定法 1877
非临床研究质量管理规范 280
非牛顿流体 2442
非色散型光谱仪 454
非线性药代动力学 903
非线性药物清除率 903
肺部沉积试验 2238
肺部给药 138, 173, 198, 335, 388, 399, 666, 1963, 2271
分布 801
分层 236, 1132
分剂量散剂 652
分离强度 239
分流进样 1174
分配系数 297
分散程序 1006
分析方法的定量限 305
分析方法的范围 305
分析方法的检测限 305
分析方法的精密度 305
分析方法的耐用性 306
分析方法的线性 305
分析方法的验证 303
分析方法的准确度 305
分子力学 626
分子模型 623
分子印迹高分子 932
分子蒸馏 2200
粉剂 229, 652
粉末剂 1471
粉末流动性 331
粉末取样 338
粉末上药法 2454
粉末填充 2334
粉末吸入装置 401
粉末制剂 333
粉碎 2208
粉体 432
粉体流变仪 442
风化 1711

缝隙腐蚀 2558
敷剂 640
敷料 1221
伏安法 1871
伏安法分析 596
伏安检测法 1875
氟橡胶 2465
辐射灭菌 998, 2212
腐蚀 2557
负荷剂量 905, 1779
复合 272
副作用 1727
赋形剂 320, 355, 360, 2156
赋形剂的安全性 355, 375
傅里叶转换红外光谱 454, 1717
富马酸 1009
腹腔内给药 1862

G

改进气体环境包装法 1702
盖仑制剂 638
干法制粒 1011, 2486
干法制粒压片 1040
干粉气雾剂 1966
干粉吸入剂 293, 322, 335, 388, 399, 2235
干固体填充 2336
干凝胶敷料 1223
干扰素 1242
干热灭菌法 405, 2212
干糖浆 2512
干燥 410, 830, 2204
干燥器 2206
干燥稳定剂 840
甘氨酸 836
甘氨酸碳酸钠 1010
甘草单铵盐 1487
甘露醇 288, 289, 365, 828, 836, 1487, 2420
甘油 1062, 1131, 1487, 2608
甘油单硬酯酸 292
甘油剂 646
甘油凝胶剂 646
甘油酯 862
肝清除 1755
感温型水凝胶 1349
刚性 980
高岭土 287
高通量筛选 1238, 1241, 1937

高通量有机合成 1937
高温火焰光度法 595
高效空气粒子过滤器 161
高效粒子空气过程器 23
高效液相色谱 74, 554, 1162, 1248
高压供电 2554
高压均质机 735
膏剂 651
隔离装置 2229
给药方案 905, 1777, 1783
工序能力 1394
工序实现指数 1398
工序位移指数 1398
工序中央指数 1398
工艺放大 847
工艺放大和产品批准后的变更 422, 1266
工艺验证 2424
工艺优化 2662
供电和分支电路的规划 2554
共沉淀 426
共聚物 1981, 2672
共溶剂 290
共熔体 860
共熔物 426
共蒸发物 426
枸橼酸 1008
构象多态现象 1764
构象异构体 2290
构象异构现象 2294
构效定量关系 630
孤儿受体 1945, 1950
谷氨酸钠 1487
谷胱甘肽结合反应 1834
骨架系统 289
固定相 1151, 1163, 1176
固态检测仪 252
固态溶液 427, 860
固体分散体 426, 860, 864, 1687
固体干燥工艺 415
固体剂型 432, 2121
固体溶液剂 1866
固体脂质纳米粒 294
固体制剂 287, 762, 779
寡聚核苷酸 1431
寡聚体 1431, 1433
管制容器 1653
惯性撞击分析器 142
灌肠剂 291, 644, 2078

灌洗剂 643
光电二极管阵列检测器 1167
光毒性试验 1744
光度滴定 109
光解作用 1771
光敏化 1771
光敏剂 1771
光谱带宽 511
光谱法 492
光谱分辨率 511
光谱分析 450, 461, 466, 475, 488, 494
光吸收 506
光学异构体 2291
光致电离检测器 1175
光子校正光谱 748
广告 66, 266
归一化法 1178
硅胶 2465
硅酸镁锂 292
硅酸镁铝 288, 292
硅酮敷料 1225
硅橡胶 2051
癸二酸二丁酯 765
癸二酸和二-(4-羟基苯甲酸)-1, 3-丙烷的共聚酸酐 759
4-癸基唑烷-2-酮 1970
1-[2-(癸硫基)乙基]吡咯烷-2-酮 1970
滚压法 2486
滚压机 2489
滚压制粒 2486
国际协调会议 1065, 1636
国际药典 1277
国际药学文摘 2132
国家处方集 385
果胶 757, 983
果糖 1487
过饱和度 679, 717
过程控制 913, 2550
过孔流动 436
过滤 1479, 2202
过滤灭菌 1669
过滤器 24, 517, 520, 2203
过敏反应 1727
过氧化 2646

H

海藻酸 288, 756, 982

- 海藻酸钙敷料 1223
 海藻酸钠 288, 292
 海藻酸盐 2672
 海藻糖 365, 840
 氦离子化检测器 1175
 含漱液 291
 焊接 2565, 2570
 合并 1132
 合剂 648
 核磁共振 275, 554, 630, 1717, 1795, 2528
 核磁共振光谱学 1767
 核苷 1431
 核苷酸 1431, 1816
 核酸适体 931
 核心流 434
 黑升麻 1384
 亨利定律 2376
 红铁粉 2567
 红外光谱法 450, 865
 槲皮苷 2651
 糊剂 5, 292, 648, 1473
 琥珀酸 861
 互联网 69, 2134, 2548
 互认程序 1006
 花生油 2608
 滑动角 436
 滑石粉 287, 289, 435, 765
 滑移 233
 化学发光 932
 化学发光测量法 2653
 化学发光免疫分析 956, 1251, 1252
 化学放大 1877
 化学降解 2670
 化学位移 2529
 化学文摘 2132
 化妆品 544, 547, 2122
 还原 1832
 环糊精 376, 550, 562, 1459, 2161, 2301
 α -环糊精 552
 β -环糊精 552, 559, 755
 γ -环糊精 552
 环-模具颗粒磨 612
 环氧乙烷-环氧丙烷共聚物 754
 环氧乙烷灭菌 2212
 缓冲剂 364, 788, 2093
 缓冲盐 291
 缓释制剂 289, 429, 864, 1123, 1124
 黄蓍糖 755
 黄原胶 756
 磺化反应 1834
 磺酸环糊精 560
 回顾性验证 2424
 混合 233, 331, 391, 700, 1036, 2209
 混合机 2211
 混悬剂 291, 583, 654, 721, 1472, 1685, 1866, 2122, 2266, 2450, 2688
 混悬注射剂 2090
 活度系数 2136
 活化分析 255
 活化极化 2560
 活化剂 2466
 活性药物成分 2431
 火棉胶 642
 火焰法 488
 火焰光度法 593
 火焰光度检测器 1175
 火焰离子化检测器 1173
- ### J
- 机械分散装置 1958
 机械力激活型给药系统 1992
 肌肉给药 1861
 肌肉注射 208, 217, 1059, 1256, 1301
 基因 1434, 1795
 基因缺陷型疫苗 2309
 基因学 494
 基因治疗 1238, 1240
 基因组 1431
 基因组学 1240, 1939
 基质效应 490
 激光散射 2117
 激光衍射法 53
 激活调控型给药系统 1989
 激素 1241
 极谱分析 596
 即可用胶塞 (RtU) 2468
 急性毒理 149
 急性毒性试验 1738
 集中程序 1006
 几何异构体 2293
 挤出 606
 挤出滚圆法 2457
 挤压包衣技术 2040
 挤压喷雾剂 1958
 计划性偏差 915
 计算化学 624
 计算机 75, 283, 1453, 1921, 2359, 2543
 计算机断层摄影术 2235
 计算机辅助药物设计 623, 630
 计算机系统的验证 618
 计算机系统验证 895
 技术转让计划与报告 915
 技术转移 856, 2427
 技术转化 2434
 剂量的确定 1777
 剂量-应答关系 1780
 剂型设计 661
 加压包衣片剂 2040
 颊和舌下途径给药 2033
 甲基化反应 1835
 甲基化环糊精 560
 甲基纤维素 292, 755, 984, 1130
 间接的药理应答 1780
 检测限 1169
 剪切变稠 2442
 剪切变稀 2442
 剪切池 440
 减毒活疫苗 2308
 简单低共熔混合物 427
 简单凝聚 993
 简单蒸馏 2200
 简谐波 2555
 简要新药申请 382
 浆法 1120
 交叉耐受性 1930
 交叉设计 1790, 1825
 交叉依赖性 1930
 交互式语音 (IVR) 系统 2548
 交联聚维酮 39, 288
 交联羧甲基纤维素 2338
 交联羧甲基纤维素钠 38, 288
 胶浆剂 648
 胶囊 290, 320, 641, 1471, 1866, 2332, 2333
 胶囊型脉冲制剂 2043
 胶凝点 979
 胶乳敏感性 2472
 胶塞的表面改性 2473
 胶塞的灭菌 2468
 胶束 2147
 胶束化 785

胶体 669, 2685
 胶体剂 291, 822
 胶体矿物 670
 胶体磨 738
 胶体释药系统 673
 胶原 981, 2672
 胶原敷料 1225
 胶原罩 2049
 胶质 755
 焦亚硫酸钠 2608
 角叉菜胶 147, 982
 矫味剂 291, 292, 787, 1012, 1481
 接触角 1682, 2048
 洁净室 34
 结肠定位给药 1366, 2000, 2019
 结构异构体 2290
 结合反应 1833
 结合水 1711
 结晶 679, 717, 882, 2202, 2483
 结晶度 883, 1537
 结晶溶剂 717
 颌草 1388
 解吸 1711
 金属氧化物半导体场效应晶体管 1872
 近红外光谱 461, 695
 近紫外 1287, 1288
 浸膏剂 645
 浸渗敷料 1224
 浸析 2213
 浸渍 2213
 禁食 1607
 经皮给药 219, 704, 1350
 经皮控释治疗系统 1982
 经皮脉冲离子导入系统 1993
 晶核形成 680, 682
 晶粒间腐蚀 2559
 晶癖 663, 715
 晶体 686
 晶型 686, 2483
 精氨酸 365
 精馏 2200
 精密度 1168
 精确性 1404
 径向分层 236
 竞争性方式分层 237
 静脉滴注 1256
 静脉给药 214, 965, 1861, 2606
 静脉注射 1059, 1256, 1302
 静脉注射液塑料容器 2608

静态淬灭 477
 静态流动 436
 酒剂 656
 酒石酸 289, 1008, 1487
 局部释药 1598
 咀嚼片 289
 锯草 1387
 聚(1, 3-二对羧基苯氧基丙烷) 2675
 聚D, L-丙交酯 2670, 2672, 2674
 聚L-丙交酯 758
 聚L-丙交酯-乙交酯共聚物 758
 聚氨基酸 2672
 聚氨酯胶 2465
 聚丙交酯 994
 聚丙烯酸 754, 755
 聚丙烯酰胺 754, 755, 756, 986
 聚对苯二甲酸 2675
 聚对苯二甲酸酐 758
 聚对二氧环己酮 758
 聚对二氧环己烷 758
 聚二甲基硅氧烷 1012
 聚二氧环己酮 2672, 2674
 聚富马酸 2675
 聚癸二酸 2675
 聚癸二酸酐 758
 聚合酶链式反应 1238, 1241, 1431, 1433
 聚合膜、骨架联用型给药系统 1984
 聚合物骨架型扩散控释给药系统 1983
 聚合物膜控型给药系统 1981
 聚合物泡沫敷料 1222
 聚环氧乙烷 754, 755
 聚集多形态 1764
 聚己内酯 758, 2050, 2672, 2674
 聚甲基丙烯酸酯 290, 764
 聚甲基氰基丙烯酸酯 757
 聚间苯二甲酸 2675
 聚赖氨酸 754, 755
 聚磷酸酯 2672, 2678
 聚磷脂 2672, 2677
 聚磷酸酯 2672, 2678
 聚醚砜 518
 聚醚酯 757
 聚偏二氯乙烯 518
 聚羟基丁酸酯 757, 2672, 2674
 聚羟基丙烯酸甲酯 754
 聚 β -羟乙基甲基丙烯酸酯 755
 聚羟乙酸 376

聚乳酸 376, 2050
 聚三亚甲基-二对氧苯甲酸酐 758
 聚山梨酯 292, 838, 1142, 2608
 聚四氟乙烯 518
 聚酸酐 376, 2050, 2672, 2675
 聚碳酸丙二酯和乙交酯共聚物 758
 聚糖酐敷料 1223
 聚烷基氰基丙烯酸酯 2050
 聚酰胺 2672
 聚亚磷酸酯 2672, 2678
 聚氧乙烯(PEO)聚合物 861
 聚氧乙烯蓖麻油 EL 361
 聚氧乙烯山梨醇单油酸酯 2608
 聚乙醇酸 2050
 聚乙二醇 289, 360, 365, 765, 861, 1011, 2608
 聚乙二醇甘油酯 862
 聚乙交酯 758, 2670, 2672, 2674,
 聚乙酸乙烯酯 290
 聚乙烯 290
 聚乙烯吡咯烷酮 288, 361, 365, 755, 764
 聚乙烯醇 289, 754, 755, 986, 2049
 聚异戊二烯胶 2465
 聚原酸 2672
 聚原酸酯 2050, 2676
 聚酯 2670, 2672, 2674
 绝对生物利用度 1821
 均聚物 2672
 均相电流免疫测定法 1877
 均一成核 682
 均匀腐蚀 2558
 均匀系数 438
 均质化 735

K

卡波姆 985
 卡瓦胡椒 1386
 抗坏血酸 2608
 抗坏血酸盐 363, 2649
 抗黏剂 765, 919, 1687
 抗凝剂 919
 抗体 2343
 抗体片段 2343
 抗压试验 768
 抗氧化剂 291, 362, 788, 1131, 2093, 2466, 2645, 2647, 2608
 抗药抗体 931
 抗原性试验 152

- 抗原致敏性试验 1744
 抗肿瘤药 275
 颗粒剂 287, 646, 1471
 颗粒磨 612
 壳多糖 757
 壳聚糖 274
 可见-紫外光谱 275
 可可脂 293
 可生物降解聚合物 2670, 2672, 2674
 可生物吸收聚合物 754
 克隆 1239, 1949
 空调 2200
 空间效应 554
 空气动力学直径 200, 747, 2276
 空气压力喷雾器 2272
 空气助流式滚圆机 2458
 空腔腐蚀 2558
 空腔泡沫敷料 1222
 控释制剂 1123, 1867, 1981, 1984, 2016, 2079
 口服给药 171, 216, 333, 968, 1062, 1299, 1356, 2012, 2324
 口含片 289
 口腔给药 666, 1861
 口腔黏膜给药 172, 1369, 1374, 2030
 库仑滴定 107
 扩散试验 522
- ## L
- 拉紧 1681
 蜡 290, 792
 蜡剂 642
 赖氨酸 1805
 篮法 1119
 老年人用药 294, 801
 酪氨酸 1806
 雷诺数 2178
 类胡萝卜素 2648
 类黄酮 2651
 类维生素 A 2649
 类脂 816
 类脂剂型 821
 类脂质体 1973
 冷冻断裂技术 2115
 冷冻干燥 680, 827, 847, 1423, 2207, 2090
 冷冻制丸法 2460
 冷却 859
 冷霜 292
 冷原子法 489
 离浆 980
 离散变量 1404
 离析 332
 离线清洁 1229
 离心 234
 离心过滤 2204
 离子导入 188, 869
 离子导入激活型给药系统 1993
 离子对 2021
 离子对色谱 1165
 离子感应场效应晶体管 1872
 离子激活型给药系统 1994
 离子交换 2574
 离子交换色谱 1165
 离子交换树脂 1488
 离子色谱 1165
 离子选择性电极 (ISE) 1872
 理论塔板数 1163, 1172
 立体构型异构 2290
 立体化学转化 1836
 立体异构 1310
 粒径分布 331, 742
 连续变量 1404
 量子力学 625
 料斗设计 435
 邻苯二甲基醋酸纤维素 290, 755, 756
 邻苯二甲酸醋酸纤维素酯 764
 邻苯二甲酸二乙酯 765
 邻苯二甲酸聚乙烯乙酸酯 764
 邻苯二甲酸羟丙甲纤维素酯 764
 临床试验药品 911
 临床数据管理系统 889
 临床研究 1788
 临床药代动力学 896
 临床用药品 911
 临界胶束浓度 1681
 临界相对湿度 1890
 磷光 475, 476
 磷酸二钙 288
 磷酸硫化寡聚核苷酸 1431
 磷酸钠 1009
 磷酸氢钙 2420
 流变学 606, 980, 2440
 流出角 436
 流动度 2441
 流动相 1151, 1166, 1169
 流动性 432, 2337
 流动注射再生的表面免疫测定法 933
 流化床 763, 917
 流化床包衣 862
 流化床干燥 416
 流化床干燥机 1038
 流化床制丸 2455
 流计数器 748
 流浸膏剂 645
 流能磨 585
 流体动力伏安法 1872
 流体动力学压力激活型给药系统 1991
 流体流动 2176
 流体学 2117
 流通池法 1122
 流延薄膜 611
 硫化促进剂 2466
 硫化剂 2466
 硫化学发光检测器 1175
 硫唑嘌呤 273
 漏斗流 434
 卤丁基胶 2465
 滤网截留和吸附络合截留 520
 露点 2201
 绿茶 1386
 氯丁胶 2465
 氯化钠 288, 365, 836, 1487
 氯化钠当量法 2382
 氯甲酚 292, 363
 卵磷脂 292, 361, 376, 1503
 络合滴定 104
 络合法 275, 2608
 络合作用 550
- ## M
- 麻黄 1386
 马丁德尔大药典 2131
 马氏体钢 2562
 吗啉寡聚体 1431
 麦芽糊精 114
 麦芽糖 365
 脉冲给药系统 2039
 漫反射光谱 466
 莽草酸 1798
 毛细管电泳 1252
 毛细管电泳免疫测定法 933
 没食子酸丙酯 363
 酶 1795
 酶电极 1876

酶反应器 1875
酶激活型给药系统 1994
酶解型聚合物 2005
酶联电化学技术 1875
酶联免疫测定法 923, 929, 952
酶联免疫吸附测定法 923
酶联免疫吸收分析 1251
酶血液凝聚因子 1243
酶增殖免疫测定技术 1877
美国药典 16, 385, 1065, 1467, 1632, 1654, 1665, 1710, 2131, 2166, 2573
美国专利和商标局 2133
蒙脱石黏土 986
密度 2267
棉籽糖 840
棉籽油 2608
免疫测定法 923
免疫电极 1877
免疫调节 2316
免疫毒性试验 1746
免疫放射分析法 951
免疫分析 950, 1251
免疫结合物 2344
免疫微球 2351
免疫脂质体 2349
灭菌 1470, 2212
灭菌后可用胶塞 (RtS) 2468
灭菌注射用水 2608
明胶 288, 289, 365, 754, 757, 982, 993, 1142, 2332, 2672
明胶制剂 525
模型拟合 2191
模制片 289
模制容器 1652
膜电极 120
膜滤器 517
膜泡转运 1258
膜渗透法 554
摩擦腐蚀 2558
摩尔取代度 551
默克索引 2131
木糖醇 2420

N

纳滤 517
纳米混悬剂 591
纳米粒 961, 1423, 1868
纳米囊 961

纳米球 961
纳米乳 1145
纳米微粒 673
钠钙玻璃 1650
耐蚀性 1653
耐用性 1169
囊泡 1488, 1973
内标法 1178
内聚拱 434
内聚力 438
内流角 438
内切酶 1431
内转化 251
内转换 475
尼泊金乙酯 2608
尼龙 518
泥敷剂 641
逆转录酶 1431
黏冲 1014
黏弹性 1342, 2444
黏度 2441
黏附性 769
黏附性水凝胶 1349
黏合剂 320, 1012, 1022, 2503
黏膜给药 171
黏膜黏附 2019, 2098
鸟氨酸 1805
尿素 861
柠檬酸 289, 861, 1487
柠檬酸三乙酯和四乙酯 765
凝沉 979
凝胶 976
凝胶给药系统 1599
凝胶剂 6, 292, 646, 822, 1473, 2063
凝胶渗透色谱 1166
凝结 587
凝聚 990, 1422
牛顿流体 2441
浓度极化 2560

O

欧盟 1003
欧洲药典 1632, 1641, 1654, 1665, 2131
欧洲药品评价委员会 1004, 1066
欧洲专利局 2133

P

排泄 802

盘架式干燥 415
抛射剂 133, 293, 2276
泡核沸腾 2182
泡沫剂 1686, 2063
泡沫凝胶 1222
泡腾反应 1008
泡腾粉末 334
泡腾片 289, 1008
泡腾制剂 1008, 1014
培养基 1439, 1443
配电系统的接地 2556
配合作用 2149
喷气式撞击器 749
喷雾包衣法 1421
喷雾冻结法 781
喷雾干燥 391, 399, 585, 797, 1422, 2207, 2519
喷雾干燥喷雾凝结 2460
喷雾干燥乳糖 287
喷雾剂 293, 654, 2235
喷雾冷冻干燥 399
喷雾凝结 797, 862, 864
硼硅玻璃 1651
硼硅酸盐 518
碰撞黏附试验 769
皮肤过敏性试验 1744
皮肤用脂质体 1973
皮下控释植入剂 1989
皮下植入剂 1984
皮下注射 1256, 1301
片剂 287, 320, 655, 720, 823, 1018, 1034, 1471, 1558, 1687, 1866, 2264, 2514
片剂处方 1018
片剂强度 1045
偏振光学显微镜法 2114
漂白剂 1597
平板型剪切池 441
平衡水分含量 1711
平衡透析法 1752
平行设计 1790
评价机构 1004
苹果酸 1487
破裂力 980
葡聚糖类 2421
葡萄糖 288, 365, 1487, 2421
葡萄籽 1386

Q

气动采样器 743

- 气溶胶 51, 2270
 气雾剂 293, 639, 1686, 2235
 气相色谱 1171, 1247, 1702
 起泡点试验 522
 牵制流 1095
 前体药物 664, 785, 821, 1049, 2003, 2020
 前药的化学活化 1050
 潜溶 784, 1054
 潜溶剂 717, 784, 1054, 2142
 嵌合抗体 2343
 强度光散射法 671
 羟丙基- β -环糊精 376, 555
 羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯 756
 羟丙纤维素 754, 756, 764, 920, 984
 羟丙甲纤维素 755, 756, 764, 861, 984, 2332
 羟丙甲纤维素乙酸琥珀酸酯 764
 羟基丁酸酯 292
 羟乙基淀粉 365, 838
 羟乙甲基丙烯酸酯 2048
 羟乙基纤维素 292, 754
 羟乙酸淀粉钠 114, 2338
 侵蚀性腐蚀 2558
 亲和色谱 1165
 亲水-亲油平衡 (HLB) 1135
 亲脂性测定 1154
 青霉素 275
 青霉素 1796
 氢氟烷 134
 氢化蓖麻油 862
 氢氧化铝 986
 倾倒角 436
 清洁工序 1229
 清洁剂 1231
 清洁验证 1229, 1233, 2431
 氰丙烯酸丁酯 1225
 氰丙烯酸异丁酯 1225
 氰基丙烯酸酯 1225
 琼脂 756
 球形团聚法 2459
 区带观察 1152
 取代度 552
 取样 240, 742
 取样器 240, 340
 龋齿 1590
 去氧胆酸钠 361
 全氟代溴辛烷 1502
 全氟碳 376, 1498, 1503
 群体药动学研究 1607
- ### R
- 染色体组学 1238
 热传递 410, 2180
 热导检测器 1173
 热分析 1767
 热固定型橡胶 2466
 热机械分析 1074
 热离子检测器 1173
 热力学 879, 884
 热熔定律 1763
 热熔挤出 1094
 热塑型橡胶 2467
 热显微镜法 1075
 热向性液晶 2111
 热原 1108, 1669, 2091
 热运动 671
 热重分析法 1073, 1714
 人参 1386
 人血清蛋白 2672
 人用药品评价机构 1004
 人源抗体 2343
 日本卫生福利省 1066
 日本药典 1628, 1632
 容量常数 1753
 溶出 1261, 1265, 2337
 溶出度 424, 428, 532, 557, 721, 1118
 溶出度试验 1118, 1263, 1825, 2550
 溶出介质 1123
 溶出曲线 1120
 溶出速率 662
 溶出仪 1119
 溶剂沉淀 400
 溶剂化多态现象 1764
 溶剂挥发法 1422
 溶解度 663, 1054, 1265, 2136
 溶蚀降解 2670
 溶液/混悬液上药 2456
 溶液剂 654, 783, 1472, 1866, 2078
 熔解 881
 熔融 426, 779
 熔融法制粒 1011
 熔融-分散技术 796
 熔融-挤出 863
 熔融-凝结技术 864
 熔融造粒法 779
 熔融制丸法 2460
 融合 6
 肉豆蔻酸异丙酯 1459
 蠕变试验 2445
 乳膏 292, 2063, 2120
 乳膏剂 1, 643, 822, 1473
 乳化剂 3, 292, 361, 1129, 2608
 乳剂 292, 644, 1127, 1473, 1500, 1685, 2090, 2122, 2266, 2450, 2687
 乳胶液 670
 乳内制剂 1305
 乳糖 322, 365, 861, 2159, 2337, 2421
 乳糖醇 2420
 α -乳糖-水合物 288
 软膏 2, 1686, 2120
 软膏剂 1, 292, 649, 822, 1473, 2266
 软化点 1652
 软胶囊 290, 529, 641, 1141
 润滑剂 287, 291, 320, 435, 589, 1022, 1011, 1038, 1131, 1687, 2507
- ### S
- 噻汞撒 363
 三联体密码 1431
 三氯生 1594
 三氧化二铁 290
 三元乙丙胶 2465
 三轴剪切试验仪 442
 散剂 287, 652
 扫描电子显微镜 671
 扫描透射电子显微镜 2501
 色甘酸二钠 2119
 色谱系统 2549
 色谱柱 1163, 1175
 色散型红外光谱仪 453
 杀菌剂 1659
 筛板挤出机 613
 筛分 744, 2209
 山梨醇 290, 361, 365, 838, 1131, 1487, 2160, 2420
 闪烁检测仪 252
 商标 2627
 舌下给药 2033
 舌下片 289
 设备清洁 1229

- 射出成形 611, 1096
 γ 射线闪烁扫描技术 2238
 伸长率 767
 深层过滤器 517, 2574
 审批后的变更 1068
 肾消除 1755
 肾小球滤过率 1755
 肿凡纳明 2119
 渗透泵给药系统 290
 渗透促进剂 821
 渗透压调节剂 365
 渗透压激活型给药系统 1989
 渗透作用 671
 生长因子白细胞介素 1242
 生姜 1385
 生物标记 929
 生物产品 1238
 生物传感器 1346
 生物等效性 246, 383, 1264, 1266, 1788, 1821, 1975
 生物发生 1794
 生物敷料 1225
 生物合成 1794
 生物技术 276, 1238
 生物技术制剂 1474
 生物利用度 245, 383, 557, 1255, 1264, 1822, 1824, 1826
 生物黏附 2098, 1371
 生物溶蚀调节型给药系统 1995
 生物体鉴别 1432
 生物体液分析 1246
 生物响应型给药系统 1995
 生物信息学 1939
 生物验证 2394
 生物药剂学 1255
 生物药剂学分类系统 1020, 1265, 1822
 生物医药分析 1246
 生药学 2246
 生育酚 363, 2649
 生育力试验 1741
 生殖安全性 564
 生殖毒理 150, 1741
 圣约翰草 1387
 失效期 1065, 1068
 湿度比 414
 湿度测定 2201
 湿法制粒 287, 1011
 湿法制粒压片法 1035, 2415
 湿空气动力学 414
 湿热灭菌法 2212
 湿润剂 292, 361
 十八醇 292
 十二烷基-N, N-二甲氨基异丙酸酯 1970
 十二烷基硫酸镁 289, 1011
 十二烷基硫酸钠 288, 289, 361, 1011
 十六醇 292
 石墨炉法 489
 时辰药理学 2039
 时间分辨荧光免疫分析法 955
 时控触发型释药系统 2004
 时控给药系统 2039
 实验动物 283
 实验室控制 914, 1700
 食品 544
 食品药品监督管理局 (FDA) 380
 世界卫生组织 1277
 手性 2291
 手性固定相 2302
 手性光学 1280, 1285, 1286
 手性物质 1280
 首过肠代谢 2015
 首过代谢 904, 1864, 2032
 首过肝脏代谢 2015
 首过效应 904, 1298, 2081
 受控生产过程 156
 受体 1942
 受体亚型 1948
 兽药 1466
 兽医用药 2065
 兽用剂型 1294, 1474
 叔丁对甲氧酚 292
 叔丁基对羟基茴香醚 362, 1131
 疏水作用色谱 1165
 输液泵 2610
 输液装置 2606, 2610
 树枝大分子包合 1327
 树脂 2004
 树状大分子 1321, 1330
 数据模拟 2190
 数学模型 2188
 漱口剂 291, 1593
 衰变常数 250
 衰减全反射光谱 457
 栓剂 293, 612, 654, 1124, 1472, 1687, 2063, 2078
 双剂量给药装置 1960
 双抗体技术 951
 双室青霉素瓶系统 2609
 双特异性抗体 2344
 双重不锈钢 2563
 双轴测试仪 442
 水飞蓟素 1387
 水分 1710
 水化激活型给药系统 1993
 水胶体敷料 1224
 水解 1832, 1839
 水解激活型给药系统 1994
 水解明胶 361
 水凝胶 977, 1222, 1339, 2006, 2100
 水凝胶片 1223
 水平鼓式混合器 233
 水侵入试验 523
 四极杆质谱 1707
 松果菊 1384
 速发型过敏反应 1972
 速释制剂 2016
 塑料 610, 2565, 2571, 2609
 酸化剂 129
 髓鞘内给药 1860
 羧甲基淀粉钠 38, 288
 羧甲基环糊精 556
 羧甲基纤维素 754, 755
 羧甲基纤维素钠 288, 292, 361, 764, 983, 1130
 T
 塌陷温度 836
 坍塌 233
 碳糊电极 1873
 碳酸钙 1009
 碳酸钾 1009
 碳酸钠 1009
 碳酸氢钾 1009
 碳酸氢钠 1009
 碳酸氢盐 289
 碳酸盐 289
 汤剂 643
 糖锭剂 643
 糖膏剂 643
 糖浆剂 291, 654
 糖精 787, 1487, 2160
 糖衣片 529
 淘析器 749

特异质反应 1727

梯流 234

提取 2213

体积排阻色谱 1166

体内生物等效性 424

体内外相关性 1123, 1265

体外毒性研究 1745

替代疗法 2244

替代药物 1381, 2244

替代医疗 1381

替代制剂 1821

天冬氨酸 365

天冬酰胺 365

天然橡胶 2465

甜味剂 320, 786, 1012, 1470, 1487

填充层池 1874

填充剂 837, 2466, 2503

条例优先权 2628

调剂 1465

调剂设备 1469

调节剂量 1783

调频光谱 1704

调制管理规范 1468

萘 1459, 1801

铁素体不锈钢 2562

同质异能转换 251

统计过程控制 1394

透明质酸 755, 756, 757, 982, 1226, 2672

透皮促渗剂 1970

透皮给药 174, 185, 666, 870, 1861, 1969

透皮贴剂 1125, 2121

透皮吸收 209, 1311

透气薄膜 1221

透射电子 2500

透射电子显微镜 671, 2115, 2501

涂擦剂 647

吐温 80 361

吐温 20 361

退火 1652

褪黑激素 1387

吞噬 1258

脱玻现象 1647

脱氢表雄甾酮 1384

脱水山梨糖醇酯 292

脱乙酰壳多糖 2672

脱脂麦斯林纱 1220

脱脂棉吸收剂 1220

W

外包 58, 1844, 2485

外标法 1154, 1178

外观设计权 2627

外科吸收剂 1220

外肽酶 1359

丸剂 2512

完整性试验 19, 521, 1479

网状内皮系统 673

往复管法 1122

危险化学品 1416

微波干燥 418

微储库分配控释给药系统 1987

微粉硅胶 287

微粉化 391, 584, 1129

微剂量片 294

微晶纤维素 288, 289, 292, 2158, 2337, 2419

微孔过滤 517

微粒释放试验 521

微量电泳 2683

微量热法 554, 884, 1073, 1080

微囊 796, 920, 995, 997, 1421

微球 289, 673, 997, 1364, 1420, 2671

微乳 5, 673, 1127, 1136, 1145, 1686, 2450, 2610

微生物 1108

微生物监控 17, 156

微生物检测 1433

微生物控制 1665

微生物限度试验 16, 19, 1670

微透析法 1752

微针 1974

维持剂量 1777

维生素 C 1009

维生素 E 2649

伪多晶态 1079

胃肠运动 2013

胃排空 1259, 1862, 2325

胃滞留系统 2018

文档管理 1449

稳定剂 839

稳定性试验 1065

稳态表观分布容积 1754

无定形沉淀 428

无定形水凝胶 1223

无定形态 1079

无菌 913, 1665, 2091

无菌保证水平 1667

无菌操作 23, 1425, 1438

无菌灌装 1440, 1476, 1478

无菌规范 2391

无菌过滤 2213

无菌结晶技术 2090

无菌生产 1438, 2231

无菌试验 16, 19, 1665

无水乳糖 287

无针注射 1974, 2610

无纸文档系统 1448

物理靶向 2348

雾化剂 388

X

西黄蓍胶 288, 291, 292

西林瓶 2608

吸附 1681, 1710

吸附等温线 1711

吸附剂 287, 1711

吸管剂 1958

吸入给药 399, 1861, 1963, 2270

吸入剂 646

吸入性溶液剂 1473

吸湿等温曲线 1887

吸湿性 1890

吸收 801, 1710, 1864

吸收促进剂 200, 1459, 1867, 2021, 2084, 2156

吸收电子 2501

吸水性 1887

吸油量 2267

吸着剂 1711

稀释剂 287, 320, 1035, 2416

洗剂 291, 648, 822

系统适用性试验 306

细胞治疗 1238, 1241

细菌内毒素 19, 1108, 1111, 1669

细菌挑战性试验 520, 1479

细菌抑制 1659

先导优化技术 1919

纤维性吸收剂 1220

现场清洗 1478

线性 1169, 1413

相对生物利用度 246, 1821

相对湿度 414, 1890

相分离 990

相溶解度法 553

- 相图 860
相转变 413
相转变温度法 1135
香料 1470, 1481
香味 1481
项目管理 1490, 2548
橡胶 137, 610, 1342, 2095, 2565
橡皮膏剂 651
消毒剂 1659
消泡剂 1012
消旋化 2291
消旋体 2291
硝酸锶 1973
硝酸纤维素 518
小分子免疫测定验证 930
小容量注射剂 2088, 2095, 2606
校正片 1122
协同转运 1865
新药申请 382
性能确认 1233, 2425
休止角 436, 438
酯剂 291, 654
絮凝 586, 1132, 1133, 2688
絮凝剂 589
旋风分离器 749
旋光测定 1280
旋光色散 1280, 1281
旋转齿轮挤出机 614
选择性浸出 2558
雪花膏 292
血根碱 1594
血管输入装置 2606
血红蛋白 1513, 1514
血液替代品 1498, 1513
- Y**
- 压大片法 2486
压紧比 438
压力流 1095
压力维持试验 522
压片 1013, 1546, 1558
压片机 1546, 1560
压缩系数 437
牙膏 1592, 1595
牙科用品 1590
亚单位疫苗 2309
亚急性、亚慢性和慢性毒性试验 1739
亚硫酸氢钠 2608
亚慢性和慢性毒理 149
延迟释放制剂 289
延缓制剂 1123
延展性权利要求 2637
掩味 864
眼部给药 172, 219, 666, 969, 2103, 2048
眼膏剂 649
眼用控释植入剂 1982
眼用溶液剂 654
眼用软膏 2
眼用制剂 1062, 1473, 2088
杨氏模量 2441
杨氏系数 767
氧化 1830
氧化-还原滴定 102
氧化还原检测器 1175
氧化铁 765
药代动力学 907, 1606, 1788, 2061, 2189
药典标准 1628, 1641
药典的协调 1633
药动学 1780, 2126, 2297
药理基因组学 1939
药品 245, 544
药品的保存 1658
药品临床试验管理规范 1692
药品生产质量管理规范 15, 1697
药品主文件 1723
药物 245, 1416
药物安全性评价 1736
药物不良反应 803, 915, 1727
药物不耐受 1727
药物成瘾性 1928
药物代谢 211
药物蛋白结合率 1752
药物的暴露程度 902
药物的分布容积 900
药物的临床评价 1786
药物的清除率 897
药物的生物转化 1829, 2298
药物动力学 246, 801, 2549
药物分布 210, 900
药物降解 1771
药物开发 1490, 1900, 1910, 1918, 2476
药物滥用 1927
药物设计 73, 1935
药物输送 1347, 1957, 1969, 1981, 2000, 2012, 2030, 2039, 2048, 2056, 2078, 2088, 2098, 2111, 2324, 2343
药物索引 2131
药物稳定性 1061
药物吸收 1261, 1860, 2031
药物相互作用 805, 1758, 1788, 2125
药物信息 2131
药物研发 623, 1787
药物遗传学 906
药物治疗错误 2166
药效的耐受性 897
药效试验 1789
药效学 802, 896, 1783
药效学相互作用 2126
药学数据 2188
药用辅料 2219, 2224
夜来香油 1385
液晶 2114, 2117
液晶晶体 2450
液体闪烁体 253
液体填充 2336
液体制剂 290, 783, 2122
液雾剂 2270
液向性液晶 2112
液质联用 1251
液状石蜡 2, 289
医疗保健体制 936, 944
医师的案头参考 2131
依从性 2441
依数性 2376
仪器化 1566
酞剂 291, 644
胰液 1863
遗传因素 1910
乙醇 287, 290, 1062, 1459, 2608
乙二醇四乙酸盐 2608
乙二醇 765
乙基丙烯酸和甲基丙烯酸甲酯共聚物 862
乙基纤维素 274, 289, 756, 764, 993
乙交酯/1, 5-二噁庚烷-2-酮共聚物 758
乙交酯/ε-己内酯共聚物 758
乙交酯和聚对苯二羟乙酸乙二酯共聚物 758

- 乙酸酯 518
 乙烯-丙烯胶 2465
 乙烯-乙酸乙烯共聚物 1982
 乙酰化反应 1835
 异丙醇 287, 290
 异构体 2290
 抑菌剂 1658, 1659
 易化扩散 1865
 疫苗 2307
 阴道给药 173, 1862, 2104, 2056
 阴道制剂 2063, 2066
 银杏 1385
 引温性 1711
 引物 1431
 饮剂 291
 隐形眼镜 726, 1344
 应变点 1652
 应急电源 2555
 应力 2440
 应力裂缝腐蚀 2559
 应力-张力应变试验 767
 英国国家处方集 2131
 英国药典 1665, 2131
 荧光 475
 荧光淬灭 1706
 荧光法 554
 荧光检测器 1167
 荧光免疫分析 954, 1251
 荧光偏振免疫分析 954
 荧光效率 476
 荧光原位杂交 1432
 营养补充品 1382
 硬度系数 2441
 硬胶囊 290, 527, 794, 2265, 2332
 硬胶囊剂 1687
 硬脂酸 289
 硬脂酸钙 289
 硬脂酸镁 287, 289, 435, 1011, 2339
 硬脂酸钠 1011
 硬脂酰富马酸钠 289, 1011
 油膏剂 2266
 油剂 649
 游离水 1711
 有效期 548, 1469, 2549
 右旋葡萄糖 287
 右旋糖酐 754, 756, 2672
 鱼精蛋白硫酸盐 757
 预混剂 2609
 预胶化淀粉 288, 2421
 预验证 2424
 预装注射器系统 2609
 原位泡沫 1222
 原子吸收光谱法 488
 圆二色谱法 275, 554
 圆二色性 1280, 1282
 圆盘-模具挤压机 612
 圆盘撞击器 53
 圆形或环形剪切池 441
 运动学黏度 2441
 运行确认 620, 1233, 2425
- ### Z
- 再验证 2424
 在线清洁 1229, 1230, 2490
 在线蒸汽灭菌 1478
 藻酸盐 288, 291, 754
 皂土 291, 292
 造粒 863
 增稠剂 292, 589, 733, 788
 增溶 1327, 2136
 增溶剂 135, 361, 1684, 2085, 2092
 增塑剂 765, 919, 1097, 1142
 增味剂 1487
 展膏剂 648
 张力 2375, 2440
 张力调节剂 733, 2094
 张力速率 2440
 召回程序 1677
 遮光剂 1142
 遮味剂 1487
 折光检测器 1167
 蔗糖 129, 287, 288, 365, 787, 840, 1487, 2160
 蔗糖乙酸异丁酸酯 376
 真空干燥 418
 振动弛豫 475
 振动膜喷雾器 2284
 振实堆密度 437
 蒸发 2198, 2384
 蒸发光散射检测器 1168
 蒸馏 2199, 2575
 蒸汽压激活型给药系统 1992
 蒸气蒸馏 2199
 蒸汽灭菌法 1668, 2391
 正电子发射断层成像术 254
 正链 1431
 正相色谱 1163
 芝麻油 2608
 知识产权 2627
 脂多糖 1109, 1669
 脂肪酸 1796
 脂肪酸二聚体-癸二酸共聚物 2675
 脂质分散体 2120
 脂质体 673, 1364, 1868, 1686, 2112, 2689
 脂质体免疫分析法 957
 直肠给药 173, 210, 219, 666, 1124, 1366, 1862, 2078
 直接可逆的药理应答 1780
 直接压片 1011, 1041, 2265, 2415
 直链淀粉 287, 755
 职业接触浓度 1419
 植入剂 794, 2524, 1982
 植物 2243
 植物药 2244
 纸色谱法 554
 指示电极 1870
 制菌注射用水 2608
 制粒 918, 1013, 1036, 2487
 制丸技术 2454
 制药经济学 1603
 制药设备 2557, 2568
 质量保证 282, 1673, 2410
 质量传递 2184
 质量计划过程 2412
 质量控制 15, 912, 2410
 质量迁移 412
 质量体系 2410
 质量中间直径 390
 质谱 74, 494, 1795
 治疗指数 897
 治疗置换 248
 致癌 151, 564, 1743, 2652
 致癌性试验 2399
 致畸胎 1741
 致突变 150, 564, 1740
 中和滴定 101
 中间相 2111
 中试工厂 2581, 2592
 中试生产 2427
 重现性 1404
 重组 DNA 1238, 1239
 重组载体疫苗 2308
 轴向分层 237
 主动转运 1258
 助流剂 287, 320, 435, 1038, 1687

- 助溶剂 360, 2089
 助悬剂 292, 361, 589
 注射给药 2088, 2605
 注射剂 360, 646, 1062, 2613, 2604
 注射剂包装 2608
 注射剂胶塞 2467
 注射用乳剂 1500
 注射用水 2089, 2092, 2573, 2608
 注射用油 2089
 柱塞式挤出机 607
 柱上进样 1174
 专家系统 2359
 专利 2627, 2636
 专属性 304, 306, 1168
 转碟法 1122
 转动滤器固定篮法 1122
 转基因 1238
 转筒挤出机 613
 转子-定子高压均质机 738
 撞锤挤出机 615
 准确度 1168
 着色剂 129, 291, 292, 320, 545, 765, 787, 1012, 1142, 1470, 2253, 2259, 2466
 资料与信息管理系统 2543
 紫外分光光度法 554
 紫外-可见光检测器 1167
 自调节型给药系统 1995
 自动进样 1174
 自然老化 772
 自氧化 1702, 2645
 自由基 2646
 组氨酸 365, 1817
 组合化学 1238, 1241, 1936
 组合生物合成 1795
 组合有机合成 1936
 组织黏合剂 1225
 最大耐受剂量 1743, 1788
 最优化方法 2658
 遵从性 811
 佐剂 147, 2311
- 其他
- Acutrim®片 1990
 AeroDose 2284
 AeroEclipse 2282
 AERx 2282
 AIR™颗粒 400
 Alzet®渗透泵 1990
 Andersen 惯性撞击器 142
 Azone 1970
 Beer-Lambert 506
 BIOSIS 2132
 Boots 系统 2360
 Cadila 系统 2361
 CAplus 2132
 Capsugel 系统 2364
 CBER 1723
 CDER 1723
 cDNA 1431
 CDRH 1723
 CELLEDIRM 1973
 Cosmederm-7™ 1973
 CRF 890, 1787
 CSFAN 1723
 CVM 1723
 D, L-丙交酯-乙交酯共聚物 2670
 DDAIP 1970
 DLVO 理论 672, 1133
 DMF 类型 1724
 DNA 探针 1430, 1431
 DNA 微阵列 1939
 DNA 芯片 1939
 DNA 疫苗 2310
 dsDNA 1431
 D 值 405
 EDTA 275, 362
 EMBASE 2132
 Eudragit L 274
 Eudragit L30D 919
 Eudragit NE30D 919
 Eudragit RL 919
 Eudragit RS 919
 Faraday-Tyndall 效应 671
 FD&C 法案 2259
 FDA 67, 153, 263, 544, 565, 618, 911, 1266, 1443, 1453, 1723, 1732, 1383, 2219, 2254
 F_H 值 405
 Fick 扩散 2673
 Fick 扩散定律 1257
 Fluosol 1502
 Formulogic 2359
 Galenical 开发系统 2361
 GCP 1674, 1678
 GMP 911, 1229, 1676
 HaloLite 2283
 HBOC-201 1521
 Hill 方程 896
 Hovine FlowCaps® 402
 HPE-101 1970
 HPMC 288, 289
 Innova™ 401
 IPA 2132
 Jenike 剪切池 441
 Karl Fisher 滴定 1716
 Macro-Derms 1972
 Macroflux 1974
 Medicaid 937
 Medicare 937
 MEDLINE 2131
 Michaelis-Menten 方程 904
 Mohr 圆分析 440
 Nitro-Dur®系统 1984
 N-甲基吡咯烷酮 1459
 2-*n*-壬烷基-1, 3-二氧戊环 1970
 Ostwald 阶段定律 682
 Oxygent AF0144 1504
 PCR 1431
 PDS 和 *L*-丙交酯的共聚物 758
 PDS 和乙交酯的共聚物 758
 PEG 365, 756, 1062, 1142
 PEG 60 蓖麻油 361
 PEG 40 蓖麻油 361
 Pharm-line 2132
 pH 调节剂 733
 pH 激活型给药系统 1994
 pH 敏感型水凝胶 1342, 1349
 PLGA 376
 PNA 寡聚体 1431
 Polyolprepolymer 1972
 Pulmosphere™ 400
 QC 部门 1676
 Randall-Selitto 分析 147
 RespiMat 2281
 Sanofi 系统 2365
 SEPA 1970
 SkyePharma 401
 Solo™ 401
 Spiros® S2 402
 Sprowls 法 2382
 ssDNA 1431
 S-腺苷甲硫氨酸 1387
 Twisthaler® 402
 USP 纯化水 2573
 Van Deemter 方程 1172

-
- | | | | | | |
|-----------------|------------|---------|-----------------|-----------|------|
| White-Vincent 法 | 2382 | X 射线晶体学 | 1935 | X 射线衍射晶体学 | 1238 |
| Wurster 包衣 | 2456 | X 射线散射 | 630, 1766, 2115 | Zeneca 系统 | 2366 |
| X 射线粉末衍射法 | 1717, 1534 | X 射线衍射法 | 865 | ZETA 电位 | 2683 |
| X 射线光子 | 2500 | | | | |